

**„Verbesserung der histopathologischen
Klassifikation von Nebennierentumoren durch
genetische Differenzierung?“**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich- Schiller- Universität Jena**

von Torsten Gruschwitz

geboren am 04.07.1979 in Bad Salzungen

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	3
1.	Zusammenfassung.....	5
2.	Einleitung.....	7
2.1.	Klassifikation der Nebennierentumoren.....	8
2.1.1.	Tumoren der Nebennierenrinde.....	8
2.1.1.1.	Die Hyperplasie der Nebennierenrinde.....	8
2.1.1.2.	Das Nebennierenrindenadenom.....	9
2.1.1.3.	Das Nebennierenrindenkarzinom.....	9
2.1.1.4.	Das Myelolipom.....	11
2.1.2.	Tumoren des Nebennierenmarkes.....	12
2.1.2.1.	Das Phäochromozytom.....	12
2.1.2.2.	Das Neuroblastom.....	13
2.1.3.	Seltene primäre Nebennierentumoren.....	13
2.1.4.	Die Nebennierenmetastase.....	14
2.2.	Ätiologie der Nebennierentumoren.....	14
2.3.	Klinik der Nebennierentumoren.....	15
2.4.	Diagnostik der Nebennierentumoren.....	16
2.4.1.	Diagnostisches Procedere.....	17
2.4.2.	Feinnadelaspiration/ -biopsie.....	20
2.4.3.	Differentialdiagnose der Nebennierentumoren durch den Pathologen.....	21
2.5.	Therapie der Nebennierentumoren.....	22
2.6.	Genetik der Nebennierentumoren.....	24
2.6.1.	Genetik Nebennierentumor-assoziiierter hereditärer Syndrome.....	25
2.6.1.1.	Tumoren der Nebennierenrinde.....	25
2.6.1.2.	Tumoren des Nebennierenmarkes.....	26
2.6.2.	Genetik sporadischer Nebennierentumoren.....	27
2.6.2.1.	Tumoren der Nebennierenrinde.....	27
2.6.2.2.	Tumoren des Nebennierenmarkes.....	29
3.	Ziele der Arbeit.....	31
4.	Material und Methode der Arbeit.....	32
4.1.	Material.....	32
4.2.	Methode.....	34
4.2.1.	Isolierung der DNA.....	36

4.2.2.	DOP- PCR.....	36
4.2.3.	Markierung der DNA.....	38
4.2.4.	Hybridisierung der DNA.....	40
4.2.5.	Detektion der DNA.....	40
4.2.6.	Auswertung.....	41
4.2.7.	Statistik.....	44
5.	Ergebnisse.....	45
5.1.	Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Dignität des Tumors.....	45
5.2.	Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Größe des Tumors.....	46
5.3.	Spezifische chromosomale Veränderungen der Nebennierentumoren..	48
5.4.	Vergleich der spezifischen chromosomalen Aberrationen zwischen gut- und bösartigen Befunden.....	52
5.5.	Genetische Heterogenität der Nebennierentumoren.....	54
6.	Diskussion.....	56
6.1.	Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Dignität des Tumors.....	56
6.2.	Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Größe des Tumors.....	58
6.3.	Spezifische chromosomale Veränderungen der Nebennierentumoren..	60
6.4.	Vergleich der spezifischen chromosomalen Aberrationen zwischen gut- und bösartigen Befunden.....	63
6.5.	Genetische Heterogenität der Nebennierentumoren.....	65
6.6.	Diskussion der fraglich klassifizierten Raumforderung.....	66
6.7.	Diskussion der Ergebnisse der Nebennierenmarktumoren.....	67
7.	Schlussfolgerungen.....	71
8.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	73
	Anhang.....	I
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	I
	Lebenslauf.....	II
	Danksagung.....	III

Abkürzungsverzeichnis

Si- Einheiten

mm	Millimeter
cm	Zentimeter
µg	Mikrogramm
g	Gramm
kg	Kilogramm
s	Sekunde
min	Minute
h	Stunde
µl	Mikroliter

Allgemein

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
BSA	Bovines Serum Albumin
CCD	Charged- Coupled- Device
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CDK	Cyclin- Dependent- Kinase
CT	Computertomographie
DAPI	4,6- Diamidinio-2-phenyl-indol
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxynucleotidacid
DOP- PCR	Degenerate- Oligonucleotid- Primed Polymerase- Chain- Reaction
FDG- PET	Fluoro- Desoxy- Glucose Positronen- Emisions- Tomographie
FISH	Fluoreszenz- In- Situ- Hybridization
FITC	Fluoresceinthioisocyanat
FNA	Feinnadelaspiration
HE	Hämatoxylin- Eosin
HU	Hounsfield Unit
IGF	Insulin- Like- Growth Factor
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
JÜR	Jahresüberlebensrate
LOH	Lost of heterocycosity
k.A.	keine Angabe

MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIBG	Meta-Iodo-Benzyl-Guanidin
MRT	Magnetresonanztomographie
NF	Neurofibromatose
NIH	National Institute of Health
Nr.	Nummer
rpm	routes per minute
SSC	Standard Sodium Citrat
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonoaurat
VHL	Von- Hippel- Lindau
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
vs.	Versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Mit einer in Autopsiestudien gefundenen Prävalenz von 3 – 7 % (Angeli et al. 1997) ist der Nebennierentumor kein seltener Tumor. Durch den vermehrten Einsatz sensitiver radiologischer Diagnostikverfahren werden immer häufiger asymptomatische Tumoren an den Nebennieren entdeckt. Diese Tumoren müssen hinsichtlich ihrer Dignität eingeschätzt werden. Bei dem Großteil dieser Raumforderungen handelt es sich um gutartige Befunde wie noduläre Hyperplasien oder Adenome, welche, sofern sie asymptomatisch sind, keiner Therapie bedürfen. Bei weniger als 10% der zufällig entdeckten Nebennierentumoren handelt es sich um Nebennierenkarzinome (Mantero et al. 2000). Die Prognose dieser hochmalignen Tumoren ist derzeit extrem schlecht, was insbesondere daran liegt, dass die Diagnose zu spät erfolgt. Etwa 70% der Karzinome werden in einem Stadium III nach MacFarlane/Sullivan entdeckt (Sidhu et al. 2003), die 5- Jahresüberlebensrate liegt hier bei 5 – 25 %. Grund für die häufig zu späte Diagnose ist die eingeschränkte Möglichkeit der Bildgebung, Karzinome in Frühstadien zu erkennen. Des Weiteren liegen keine laborchemischen oder molekulargenetischen Marker vor, welche zur Diagnostik eingesetzt werden könnten. Der derzeit beste Marker für Malignität ist die Tumorgröße, laut aktuellen Therapieempfehlungen besteht die Operationsindikation ab 4 – 6 cm Tumorgröße. Bis zu 10% aller Karzinome sind kleiner als 6cm (Dackiw et al. 2001). Damit besteht die Gefahr, dass Patienten mit einer guten Prognose nicht rechtzeitig durch eine Operation therapiert werden.

Die Klassifizierung hinsichtlich der Dignität der Tumoren ist mit histologischen und immunhistochemischen Verfahren häufig nicht sicher.

Die Probleme in der Diagnostik sind zum Teil mit dem mangelnden Wissen über die Ätiologie der Nebennierentumoren zu begründen. Ziel muss es sein, die Pathogenese der Nebennierentumoren aufzuklären, um Marker zu entdecken, welche zur Verbesserung der Diagnostik, Therapie und Prognose der Nebennierentumoren führen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Nebennierentumoren hinsichtlich ihrer genetischen Eigenschaften zu charakterisieren. Es könnten damit Rückschlüsse auf die Tumorgenese gezogen werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob mithilfe eines genetischen Tests zwischen benignen und malignen Befunden differenziert werden kann. Ist dies möglich, wäre ein Einsatz genetischer Tests in der Standarddiagnostik der Nebennierentumoren denkbar.

Es wurden 27 Tumoren der Nebennierenrinde (3 Noduläre Hyperplasien, 14 Adenome, 10 Karzinome) und 5 Tumoren des Nebennierenmarkes mit Hilfe der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) analysiert.

Während nur 6 der 17 gutartigen Befunde der Nebennierenrinde genetische Alterationen präsentierten, war dies bei allen Karzinomen der Fall. Im Mittel zeigten die nodulären Hyperplasien 1,5 Chromosomen, die Adenome 1,67 Chromosomen, die Karzinome dagegen 8,7 Chromosomen pro Tumor mit genetischen Aberrationen. Der Unterschied zwischen den Dignitäten bezüglich der Anzahl genetischer Veränderungen war statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Eine Korrelation zwischen der Anzahl genetischer Veränderungen und der Größe des Tumors bestand in einem gewissen Maße für gutartige Befunde (Korrelationskoeffizient = 0,639), für die Karzinome dagegen kaum ($r = 0,262$). Zusammengefasst war die Anzahl genetischer Alterationen deutlich von der Dignität, aber kaum von der Größe der Tumoren abhängig.

Einige spezifische chromosomale Aberrationen traten in der Gruppe der Karzinome vermehrt auf. So fanden sich häufig Verluste genetischen Materials in den chromosomalen Regionen 3p (70% aller Karzinome), 18q (70%), 6q (60%), 1p (50%), 1q (40%), 6p (40%), 11/11p (30%) und 13q (40%), Zugewinne zeigten sich nur vereinzelt. Die gutartigen Befunde präsentierten nur wenige genetische Alterationen. Etwa 86% der bei den gutartigen Tumoren ermittelten Aberrationen waren auch in der Gruppe der Karzinome zu finden, was die These einer Adenom – Karzinom – Sequenz erhärtet. Ein Tumorprogressionsmodell konnte erstellt werden. Die genetischen Aberrationen Verlust 3/3p, 5/5q, 11/11p, 14q und Zugewinn 9p scheinen frühe Alterationen zu sein, die Verluste 1p, 1q, 6p, 6q, 10q, 13q, 15q, 18q und der Zugewinn 5/5p müssen als Merkmale einer malignen Transformation gewertet werden.

Alle Nebennierenmarktumoren zeigten genetische Veränderungen. Die für diese Tumoren bekannten Alterationen Verlust 1p, 3q und 17p konnten dargestellt werden. Zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Größe fand sich eine geringe Korrelation. Eine Abhängigkeit bestand zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Geschlecht der Patienten.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass eindeutige Unterschiede in der genetischen Konstellation zwischen gut- und bösartigen Nebennierentumoren bestehen. Da eine Unterscheidung zwischen den Dignitäten sicher möglich war, sollten genetische Tests in der Routinediagnostik der Nebennierentumoren eingesetzt werden. Einige chromosomale Alterationen wurden identifiziert, welche in der Genese der Nebennierentumoren von Bedeutung sind. Durch weitere molekulargenetische Untersuchungsverfahren können in Zukunft entsprechende Kandidatengene bzw. molekularbiologische Marker identifiziert werden, die in der Diagnostik der Nebennierentumoren eingesetzt werden können.

2. Einleitung

Bis vor einigen Jahren traten Nebennierentumoren relativ selten im klinischen Alltag in Erscheinung. In Autopsiestudien konnte allerdings gezeigt werden, dass Nebennierentumoren mit einer Prävalenz von 3 – 7 % aller untersuchten Patienten nicht selten sind (Angeli et al. 1997). Durch den vermehrten Einsatz immer besserer radiologischer Verfahren werden immer mehr Raumforderungen an den Nebennieren diagnostiziert. Dabei stellen diese zufällig auffallenden Tumoren eine große diagnostische Herausforderung dar. Insbesondere die Differentialdiagnostik zwischen den weitaus häufigeren gutartigen und den seltenen bösartigen Befunden ist derzeit mit den zur Verfügung stehenden radiologischen Verfahren oftmals nicht sicher möglich. Befunde wie kleine oder im Frühstadium befindliche Karzinome sind häufig nicht diagnostizierbar.

Durch Histologie und Immunhistochemie ist es mitunter schwierig, eine korrekte Klassifikation der Nebennierentumoren vorzunehmen. Die Gefahr, die bezüglich Prognoseverbesserung wichtigen grenzwertigen Befunde zu übersehen, ist mit diesen Untersuchungsmethoden nicht gering.

Die Indikation zur operativen Therapie eines Nebennierentumors besteht bei einer funktionellen Aktivität und bei Verdacht auf Malignität. Der derzeit beste Prädiktor der Malignität ist die Tumorgöße, die Operationsindikation liegt ab 4 – 6 cm Tumorgöße. Aus Sektionsstudien ist bekannt, dass bis zu 10% aller Nebennierenkarzinome kleiner als 4 – 6 cm sind. Es wäre wünschenswert, bessere diagnostische und prognostische Marker zu finden, welche einen so unsicheren Marker wie die Tumorgöße in den diagnostischen Richtlinien ablösen.

Zwar kam es in den letzten Jahren zu einer Verbesserung der konservativen und operativen therapeutischen Optionen, trotzdem ist die Prognose, insbesondere durch die meist zu späte Diagnostik, weiterhin schlecht.

Während die genetischen Veränderungen von Nebennierentumor- assoziierten hereditären Erkrankungen gut erforscht sind, ist über die Tumorentwicklung und Progression der sporadischen Nebennierentumoren wenig bekannt.

Vor dem Hintergrund einer steigenden klinischen Relevanz haben mehrere Fachdisziplinen die Notwendigkeit einer verbesserten Charakterisierung der Nebennierentumoren erkannt. Nur so können dringend erforderliche Fortschritte in Diagnostik, Therapie und Prognose erreicht werden.

2.1. Klassifikation der Nebennierentumoren

Die Differentialdiagnose der Nebennierentumoren umfasst ein weites Spektrum pathologisch-anatomisch verschiedener Tumoren, auf die im folgenden genauer eingegangen werden soll. Da die Nebennieren histologisch aus einer Rinde und einem Mark aufgebaut sind, kann man die Tumoren entsprechend der Struktur, in welcher sie entstehen, einteilen.

2.1.1. Tumoren der Nebennierenrinde

Nebennierenrindentumoren repräsentieren etwa 80% aller Raumforderungen der Nebenniere.

2.1.1.1. Die Hyperplasie der Nebennierenrinde

Als Hyperplasie bezeichnet man die Vergrößerung einzelner Struktureinheiten des Organs über die Norm hinaus. Sie können diffus oder in Form von Knoten auftreten und alle Schichten der Nebenniere betreffen.

Eine Unterscheidung erfolgt in kongenitale und erworbene Hyperplasien. Die kongenitalen Hyperplasien beruhen auf einem Effekt von Enzymen, die in die Biosynthese der Kortikoide einbezogen sind. Durch einen Mangel dieser Enzyme (am häufigsten 21- α -Hydroxylase, 11- β -Hydroxylase, 3- β -Hydroxysteroiddehydrogenase) kommt es über endokrine Regulationsschleifen zu einer vermehrten Produktion von ACTH, welches eine vermehrte Bildung von Kortisolvorstufen in den Nebennieren zur Folge hat. Dies führt zu einer diffusen Hyperplasie der Nebennierenrinde.

Häufigste Form der erworbenen Hyperplasien ist die normaktive mikronoduläre Hyperplasie mit Noduli zwischen 1 – 2 mm im Durchmesser, viele Sektionen zeigen derartige Befunde (Saeger et al. 1998). Die Entstehung beruht auf arteriellen Durchblutungsstörungen des Nebennierenparenchyms, die dazu führen, dass die mangelhaft durchbluteten Areale atrophieren, während die gut durchbluteten reaktiv hyperplastisch werden.

Typisch sind mikronoduläre Hyperplasien auch beim hypothalamisch- hypophysär bedingten Morbus Cushing. Das Gewicht der Nebennieren ist hier meist nur gering bis nicht erhöht. Mit zunehmender Krankheitsdauer kann es aber zu einem Wachstum der Knoten kommen, sodass aus Mikro- nun Makronoduli (Durchmesser > 2mm) werden. Ein Übergang in Adenome mit zunehmender funktioneller Autonomie wie bei einem primär adrenalen Cushing- Syndrom gilt dabei als möglich. So kann aus einem primär hypothalamisch- hypophysären Cushing- Syndrom ein adrenales Cushing- Syndrom werden.

Selten auftretende Veränderungen mit Hyperplasie sind die diffuse und/oder noduläre Hyperplasie bei Hyperaldosteronismus. Hier gibt es die autosomal- dominant vererbba-

Formen des Dexamethason- bzw. des Glukokortikoid- supprimierbaren Hyperaldosteronismus (Sasano et al. 2001). Außerdem existiert noch eine idiopathische Form, deren Ätiologie nicht geklärt ist.

2.1.1.2. Das Nebennierenrindenadenom

Histologisch handelt es sich um eine gutartige Vermehrung von Drüsenzellen der Nebennierenrinde. Makroskopisch stellen sich die Nebennierenadenome fast immer unilateral und solitär dar. Ihr Durchmesser liegt zumeist unter 5cm und ihr Gewicht bei unter 50g, jedoch sind auch Gewichte über 100g möglich. Sie zeigen histologisch eine gelblich-bräunliche Schnittfläche, Nekrosen fehlen. Die Adenomzellen sind meist größer als die normalen Rindenzellen, die Zellkerne sind häufig etwas vergrößert und chromatinreicher. Histologisch können differentialdiagnostische Schwierigkeiten bestehen gegenüber Phäochromozytomen und Nebennierenkarzinomen, insbesondere bei größeren lipidarmen Tumoren mit diffusen Wachstum.

Adenome sind die am häufigsten diagnostizierten Raumforderungen der Nebenniere, über 50% aller Tumoren der Nebenniere sind Adenome (Mantero et al. 2000). Die tatsächliche Inzidenz der Adenome lässt sich sehr schwierig determinieren, in verschiedenen Autopsiestudien fand man Nebennierenadenome größer 2 – 5 mm in bis zu 5,7% der Untersuchten, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter anstieg (Mansmann et al. 2004).

Nebennierenadenome können mit verschiedenen endokrinologischen Krankheitsbildern vergesellschaftet sein, die Angaben in der Literatur zur Häufigkeit von hormonsezernierenden Adenomen differieren dabei sehr: 5 – 47% aller Adenome sezernierten Kortisol, 1,6 – 3,3 % produzierten Mineralkortikoide, extrem selten fand man benigne Läsionen der Nebenniere, welche Androgene oder Östrogene sezernierten (Barzon et al. 1998, Terzolo et al. 1998, Mantero et al. 2000, Tanabe et al. 2001, Valli et al. 2001).

2.1.1.3. Das Nebennierenrindenkarzinom

Das Nebennierenrindenkarzinom ist ein hochmaligner Tumor mit schlechter Prognose. Mit einer Inzidenz von 1 – 2 Fällen auf 1 Million Personen ist es eine seltene Tumorerkrankung (Wajchenberg et al. 2000, Dackiw et al. 2001), die Altersverteilung ist bimodal mit einem ersten Gipfel im Kindesalter und einem zweiten in der 5. Lebensdekade (Luton et al. 1990, Schteingart 2001).

Die Pathogenese der Nebennierenrindenkarzinome ist weitgehend ungeklärt. Verschiedene hereditäre Tumorsyndrome gehen mit der Entwicklung von Nebennierenkarzinomen einher.

Für diese Erkrankungen konnten Keimbahnmutationen nachgewiesen werden (Mutation im p53- Tumorsuppressorgen, IGF-II- Überexpression), die allerdings nicht generell auch bei sporadischen Nebennierenkarzinomen nachzuweisen sind. Die bisher entdeckten Mutationen sind offenbar späte Ereignisse in der Malignomentwicklung, initiale Mutationen, die eine Proliferation und Entdifferenzierung einleiten, sind bisher noch nicht bekannt.

Obwohl sich bei laborchemischer Diagnostik mehr als die Hälfte der Nebennierenkarzinome als endokrin aktiv erweisen, haben weniger als 40% der Patienten aufgrund der Hormonaktivität des Tumors eine klinische Symptomatik (Wajchenberg et al. 2000, Favia et al. 2001). Die Tumoren bilden Kortisol, Androgene, Östrogene oder Aldosteron, endokrine Mischformen sind deutlich häufiger als bei den Adenomen (Venkatesh et al. 1989, Pommier und Brennan 1992). Dementsprechend können sich hormonaktive Nebennierenkarzinome als Cushing- Syndrom (30 – 40 % der Fälle) oder mit Zeichen der Virilisierung als Folge eines Androgenexzesses (20 – 30 %, vor allem bei Kindern, seltener im Erwachsenenalter) manifestieren. Seltener treten Feminisierungszeichen (6%) oder Hypertonie und Hypokaliämie (3%) auf (Ng und Libertino 2003). Da die Steroidbiosynthese der Nebennierenkarzinomzellen meist eher ineffektiv ist, liegt bei Manifestation hormoneller Symptome häufig schon eine große Tumormasse vor. Auch unspezifische Symptome wie Schmerzen, Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust treten in der Regel erst in fortgeschrittenen Stadien des Karzinoms auf, häufig wird das Nebennierenkarzinom erst aufgrund des Tumorwachstums mit Verdrängungs- oder Infiltrationssymptomen oder gar mit Zeichen der Fernmetastasierung manifest.

Die entdeckten Karzinome der Nebennierenrinde wiegen daher nahezu immer mehr als 50g, meist mehr als 100g. In einer großen klinischen Untersuchung aus dem Jahr 2000 (Mantero et al. 2000) an 1004 Patienten mit zufällig diagnostizierten Nebennierentumoren waren die Karzinome im Mittel etwa 4cm größer als die Adenome (7.5cm vs. 3.5cm).

Die großen Karzinome zeigen die klassischen pathologischen Zeichen der Malignität. Makroskopisch sind häufig Kapselinfiltrate zu erkennen, typisch ist eine von Nekrosen und Blutungen durchsetzte Schnittfläche. Mikroskopisch zeigen sich meist ein diffuser Bautyp mit Zellen, die den kompakten Rindenzellen eher ähnlich sehen als den lipidreichen, häufig sind die Zellen aber nicht mehr zuzuordnen. Die Kerne sind vergrößert, chromatinreich und pleomorph mit oft deutlichen Nukleolen. Von der ipsilateralen Nebenniere sind häufig nur Reste in der Peripherie des Tumors unscharf abgegrenzt erkennbar. Karzinome der Nebennieren, die sich in einem Frühstadium befinden, sind in der pathologischen Diagnostik mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden allerdings kaum diagnostizierbar.

Die Stadieneinteilung erfolgt nach MacFarlane und Sullivan (Macfarlane 1958, Sullivan et al. 1978) (Tabelle 1). Während die Stadien I und II auf die Nebenniere beschränkt sind, zeigen Tumoren im Stadium III eine lokale Invasion benachbarter Strukturen, Fernmetastasierungen bedeuten Stadium IV und sind im Verlauf häufig zu beobachten, vor allem Leber, Lunge, Knochen, Lymphknoten und Peritoneum sind betroffen (Alexander et al. 2002).

In Tabelle 1 ist auch die 5- Jahresüberlebensrate des Nebennierenkarzinoms dargestellt. Wenn man bedenkt, dass der Großteil der Karzinome (circa 70%, (Sidhu et al. 2003)) erst in den Stadien III und IV entdeckt wird, erkennt man die schlechte Prognose dieser Erkrankung (mediane Überlebenszeit ab Diagnosezeitpunkt 18 Monate (Crucitti et al. 1996, Wajchenberg et al. 2000) und die Notwendigkeit einer besseren Diagnostik, welche die Karzinome schon in einem früheren Stadium erfasst.

Tabelle1: Stadien nach MacFarlane und Sullivan + Prognose des Nebennierenkarzinoms.

Stadium	Lokalisation	5 - Jahresüberlebensrate
I	auf Nebenniere beschränkt, Durchmesser < 5cm	45%
II	auf Nebenniere beschränkt, Durchmesser > 5cm	30%
III	lokal invasives Wachstum oder lokale Lymphknotenmetastasen	5 – 25 %
IV	Fernmetastasen	0 – 10 %

2.1.1.4. Das Myelolipom

Myelolipome werden definiert als gutartige Tumoren, die aus reifen Fettzellen und Knochenmarkszellen aufgebaut sind. Sie finden sich nicht ausschließlich, aber zum größten Teil in der Nebenniere, eventuell auch in ektopem Nebennierengewebe. Sie treten im mittleren und höheren Lebensalter auf und werden meistens zufällig bei radiologischen oder sonographischen Untersuchungen entdeckt. Ihr Gewicht kann bis zu 5kg betragen. Sie sind scharf begrenzt und zeigen eine gelbliche Schnittfläche mit rötlichen und rot-braunen Herdbildungen. Oft werden sie von einem schmalen Saum erhaltenen Nebennierengewebes überzogen. Mikroskopisch zeigt sich ein Nebeneinander von reifen Fettzellen und hämatopoetischen Zellelementen mit allen drei Zellreihen. Selten können auch Knochen trabekel entwickelt sein.

Große Myelolipome können aufgrund einer Einblutung oder einer zentralen Nekrose symptomatisch werden.

2.1.2. Tumoren des Nebennierenmarkes

Nebennierenmark und Nebennierenrinde sind aufgrund der embryologischen Entwicklung in Anatomie, Physiologie und dementsprechend Pathologie verschieden. Die Tumoren, die man im Nebennierenmark findet, sind mit den Nebennierenrindentumoren nicht vergleichbar.

Das Nebennierenmark gehört zum sympathischen Teil des paraganglionären Gewebes, hier kommt es zur Differenzierung von Neuroblasten zu chromaffinen Phäochromozyten. Diese Zellen produzieren Katecholamine und verschiedene Signalpeptide. Die häufigsten Tumoren des Nebennierenmarkes sind die Neuroblastome bei Kindern und die Phäochromozytome bei Erwachsenen. Andere primäre Tumoren wie Ganglioneurome, Schwannome, Neurofibrome oder maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) sind extrem selten.

2.1.2.1. Das Phäochromozytom

Am häufigsten sind Phäochromozytome im Alter zwischen 40 und 50 Jahren, sie können allerdings in allen Altersgruppen auftreten, so auch bei Kindern. Beide Geschlechter sind etwa gleich häufig betroffen. Die Inzidenz schwankt zwischen 8 Fällen auf 1 Million in den USA und 2 Fällen auf 1 Million in Skandinavien (Lack EE 1997). Die Prävalenz eines Phäochromozytoms bei Patienten mit einem Inzidentalom der Nebenniere beträgt 4 – 11 % (Mantero et al. 2000).

Zu etwa 10% treten sie bilateral auf, zu ca. 10% sind sie maligne. Etwa zwei Drittel der Phäochromozytome sind endokrin aktiv und produzieren Adrenalin und Noradrenalin. Damit können sie Ursache einer paroxysmalen oder permanent auftretenden Hypertonie sein. Außer dem Bluthochdruck finden sich meistens eine Tachykardie, Kopfschmerzen, Schwitzen, Tremor und eine Hyperglykämie. Etwa 10% aller Phäochromozytome sind extra- adrenalen Ursprungs, sie sind entlang des Grenzstranges oder auch in der Harnblase lokalisiert (Whalen et al. 1992).

Ein Teil der Phäochromozytome tritt sporadisch auf, deren Ursache ist unbekannt. Zum anderen gibt es aber Formen, die familiär gehäuft auftreten und mit bestimmten Syndromen assoziiert sind. Diese Syndrome sind die Multiple- Endokrine- Neoplasie Typ 2 (MEN 2), das Von- Hippel- Lindau- (VHL-) Syndrom und die Neurofibromatose Typ 1. Hier liegen gut erforschte Keimbahnmutationen in verschiedenen Genen vor.

Makroskopisch sind die sporadischen Phäochromozytome, die 90% aller Phäochromozytome ausmachen, solitäre, runde Tumoren mit einer Größe zwischen 2 und 10 cm und einem Gewicht zwischen 50 und 150 g (Schroder et al. 1995).

An ihrer Oberfläche sind die Phäochromozytome von der Nebennierenrinde abgrenzbar, wobei einzelne Tumorzellen in die kortikalen Zellschichten eindringen können. Die Tumorzellen sind zumeist groß und polygonal und besitzen ein eosinophiles granuläres Zytoplasma sowie einen runden Zellkern. In vielen Phäochromozytomen finden sich auch große polygonale Zellen, ohne dass dieses als ein Hinweis auf Malignität zu werten ist.

Außer Adrenalin und Noradrenalin können die Tumorzellen auch Somatostatin, Neuropeptid Y, vasoaktives- intestinales- Peptid (VIP) und/oder ACTH produzieren. Bei starker VIP – Produktion entwickelt sich klinisch ein Verner-Morrison-Syndrom, bei starker ACTH – Produktion ein Cushing-Syndrom (Terzolo et al. 1994, Chen et al. 1995).

Seltener sind die malignen Phäochromozytome, sie von den gutartigen zu unterscheiden ist bis auf den Nachweis von lymphogenen oder hämatogenen Metastasen (Lunge, Leber) nicht möglich. Lokale Invasion in das umliegende Gewebe und ein hohes Tumorgewicht (>150g) sind Hinweise auf Malignität.

2.1.2.2. Das Neuroblastom

Neuroblastome sind hochmaligne Tumoren, welche aus entdifferenzierten Neuroblasten entstehen. Sie treten zu 40% in der Nebenniere auf, die weiteren 60% finden sich an verschiedenen Lokalisationen des neuroendokrinen, paraganglionären Gewebes.

2.1.3. Seltene primäre Nebennierentumoren

Erwähnt werden sollen die Nebennierentumoren, die zwar selten vorkommen, in der Differentialdiagnostik trotzdem eine wichtige Rolle spielen.

Zwar sind primäre Nebennierenlymphome sehr selten (etwa 80 Fälle sind beschrieben (Wang et al. 1998, Mermershtain et al. 2001), eine sekundäre Beteiligung der Nebennieren bei malignen Lymphomen ist allerdings recht häufig zu finden (Falchook und Allard 1991).

Selten kommen auch die Adenomatoidtumoren der Nebenniere vor. Sie sind mesothelialer Herkunft und durch drüsenartige Spalträume im Bindegewebe gekennzeichnet, zur umliegenden Nebenniere sind sie oft unscharf begrenzt.

Hämorrhagien, die zu einer Raumforderung an den Nebennieren führen, können unterschiedliche Gründe haben. Einseitige Blutungen treten vor allem nach Trauma oder nach einseitiger Nebennierenvenenthrombose auf, Blutungen in beide Nebennieren findet man bei Komplikationen einer Antikoagulantientherapie, bei Verbrauchskoagulopathie nach Trauma oder Sepsis (Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom) oder bei anderen Zuständen einer Koagulobzw. Thrombozytopathie (Dunnick und Korobkin 2002).

Auch Zysten können an den Nebennieren vorkommen. Nach dem Entstehungsmechanismus unterscheidet man angeborene, posttraumatische oder parasitäre Zysten. In der Regel sind sie klinisch unauffällig.

Eine Manifestation mit Nebennierenraumforderung kann bei der Tuberkulose vorkommen.

Extrem selten sind primäre Tumoren wie Schwannome, Neurofibrome, maligne periphere Nervenscheidentumoren, maligne Melanome sowie mesenchymale Tumoren (Hämangiome, Angiosarkome und Leiomyosarkome).

2.1.4. Die Nebennierenmetastase

Aus Sektionsstudien (Saeger et al. 1998) geht hervor, dass folgende Primärtumoren in die Nebennieren häufiger metastasieren: Bronchialkarzinome (in 22,5% der in den Sektionsstudien untersuchten Fälle), kolorektale Karzinome und Pankreaskarzinome (jeweils 13,3%), Mammakarzinome (11,4%), Prostatakarzinome (11,1%), Harnblasenkarzinome (4,4%), Ovarialkarzinome (4,4%). Die Metastasen sind nahezu immer Teilbild einer ausgedehnten Metastasierung, selten liegen isolierte Metastasen in den Nebennieren vor. In etwa der Hälfte der Fälle findet sich ein bilateraler Befall der Nebennieren. Circa 20% der Metastasen sind kleiner als 1mm, ca. 60% zwischen 1 – 10 mm und ca. 20% größer als 10mm. In 2 – 18 % sind Metastasen Ursache einer unklaren Raumforderung an der Nebenniere (Gaboardi et al. 1991, Ambrosi et al. 1995), bei Patienten mit einem bekannten Karzinom anderen Ursprungs sind es 50 – 75 % der unklaren Raumforderungen (Glazer et al. 1982, Lenert et al. 2001).

2.2. Ätiologie der Nebennierentumoren

Für hereditäre Syndrome, welche mit der Entwicklung von Nebennierentumoren einhergehen, konnten sowohl die Mechanismen der Vererbung als auch die den Krankheiten zu Grunde liegenden Alterationen des Genoms ermittelt werden (siehe Kapitel 2.6. Genetik der Nebennierentumoren).

Für die sporadischen Nebennierentumoren sind bisher nur wenige Faktoren, welche die Tumorgenese beeinflussen, bekannt. Der Einfluss des Alters scheint eine gewisse Bedeutung zu haben. Es wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass die Inzidenz der Adenome mit steigendem Alter zunimmt (Mansmann et al. 2004). Für Nebennierenrindenkarzinome wurde eine zweigipflige Altersverteilung ermittelt (Luton et al. 1990, Schteingart 2001). Phäochromozytome manifestieren sich klinisch vor allem zwischen dem 40 – 50 Lebensjahr.

Abhängig vom Geschlecht gibt es keine Unterschiede in der Prävalenz sporadischer Nebennierentumoren (NIH 2002).

Der Einfluss weiterer klassischer Risikofaktoren wie die familiäre Prädisposition, die Einwirkung exogener Noxen wie Ernährung, Alkohol- oder Nikotinabusus und andere sind nach unserem Wissen für die sporadischen Nebennierentumoren nicht bekannt.

Die Fortschritte, welche in der molekulargenetischen Charakterisierung vieler anderer Tumoren des Menschen erreicht wurden, konnten für die sporadischen Nebennierentumoren bisher nicht erzielt werden, hier befindet sich die Forschung in einem noch sehr frühen Stadium.

Will man die Diagnostik und Therapie der sporadischen Nebennierentumoren verbessern, muss man versuchen, die derzeit eher geringen Kenntnisse über Ätiologie und Pathogenese dieser Tumoren zu steigern.

2.3. Klinik der Nebennierentumoren

Aufgrund der immer früheren Diagnose von Nebennierentumoren präsentieren immer weniger Patienten die verschiedenen klassischen Symptome der Nebennierenerkrankungen. Abhängig von der Lokalisation können die Nebennierenrindentumoren etwa das Conn-Syndrom, das Cushing- Syndrom und / oder das Adreno- Genitale- Syndrom (AGS) imitieren. Da sowohl benigne als auch maligne Tumoren der Nebenniere in etwa gleicher Häufigkeit mit Symptomen dieser Erkrankungen einhergehen, ist niemals anhand der Symptomatik eines Patienten eine Dignitätseinschätzung des Nebennierentumors möglich.

Das Syndrom des Morbus Conn beschreibt einen pathologischen Funktionszustand der Zona glomerulosa. Hierbei handelt es sich um einen primären Hyperaldosteronismus mit der Symptomgruppe arterielle Hypertonie (Kopfschmerzen), metabolische Alkalose, Hypernatriämie sowie Hypokaliämie (Schwäche und Obstipation).

Den pathologischen Zustand des Hypercortisolismus beschreibt das bekannte Cushing-Syndrom. Symptome dieser Erkrankung sind die Fettumverteilung (sog. Stammfettsucht mit Nackenpolster und Plethora), Striae rubrae distensae, Pergamenthaut, eine diabetogene Stoffwechsellage, arterielle Hypertonie, Hypokaliämie und Osteoporose.

Nebennierentumoren können durch eine dysregulierte Sekretion von Sexualsteroiden auch ein Krankheitsbild der Zona reticularis imitieren, das Adreno- Genitale- Syndrom (AGS). Die Symptomatik ist gekennzeichnet durch eine Hodenatrophie, Gynäkomastie und Infertilität bei Männern bzw. einer Virilisierung mit Hirsutismus, fehlender Menstruation und Klitorishypertrophie bei Frauen.

Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust sind Anzeichen auf das Vorliegen eines malignen Prozesses. Für das Nebennierenkarzinom ist typisch, dass es diese Symptomatik sehr spät präsentiert. Auch Symptome wie Abdominalschmerzen oder palpabler Tumor treten im Allgemeinen spät auf und sind, wenn die Ursache ein Karzinom der Nebennieren ist, mit einer schlechten Prognose verbunden.

2.4. Diagnostik der Nebennierentumoren

Die Indikation zur Diagnostik von Nebennierenerkrankungen hat sich in den letzten Jahren verändert. Zur Zeit der nicht flächenhaft verfügbaren sonographischen und schnittbildgebenden Verfahren führten die klinischen Beschwerden des hormonellen Exzesses den Patienten einer endokrinologischen Diagnostik zu. Nach endokrinologischer Charakterisierung der zugrunde liegenden Störung wurde dann gezielt nach der Quelle der Hormonsynthese gesucht, bildgebende Verfahren führten schließlich zur Diagnose eines Nebennierentumors. Die Diagnose des Nebennierentumors stand somit am Ende einer diagnostischen Kette, die ihren Ausgang in einer typischen, endokrinologischen klinischen Symptomatik hatte.

Dieses Bild hat sich in den letzten 10 – 20 Jahren geändert. Durch den vermehrten Einsatz und die Verbesserung der Qualität der radiologischen Verfahren treten vermehrt Patienten auf, bei denen zufällig im Rahmen einer bildgebenden Untersuchung ein Tumor der Nebenniere gefunden wird. Diese als Inzidentalome bezeichneten Nebennierentumoren sind keineswegs selten, die Prävalenz dieser Diagnose in der abdominalen CT liegt in einem Kollektiv von Patienten im mittleren bis höheren Lebensalter bei 2 – 5 % (Gajraj und Young 1993, Caplan et al. 1994).

Die zufällig an den Nebennieren auffallende Raumforderung stellt eine große diagnostische Herausforderung dar. Der Kliniker muss einerseits eine unnötig lange und teure Diagnostik, Therapie und Nachsorge der weitaus häufigeren benignen Befunde vermeiden, andererseits ist es aufgrund der prognostischen Relevanz extrem wichtig, die seltenen malignen Tumoren möglichst schon in einem frühen Stadium sicher zu erkennen.

Wird eine Raumforderung an den Nebennieren entdeckt, muss man durch weiterführende Diagnostik folgende Fragen beantworten:

1. Mit welcher Wahrscheinlichkeit ist der vorliegende Befund als maligne anzusehen? Ist die gegebenenfalls maligne Raumforderung primär adrenalen oder extra-adrenalen Ursprungs?
2. Ist der Befund hormonell aktiv?
3. Besteht eine Operationsindikation?

2.4.1. Diagnostisches Procedere

Wie oben beschrieben wird heutzutage eine erste Verdachtsdiagnose meist vom Radiologen bei der Durchführung bildgebender Verfahren gestellt. Daran sollte sich immer eine exakte Anamnese und gründliche klinische Untersuchung anschließen. Bluthochdruck, Gewichtszu- oder -abnahme, Virilisierung, Feminisierung, oder klinische Manifestationen eines Katecholaminexzesses geben Anhalte für die Ursache der Nebennierenvergrößerung. Sehr aufmerksam sollte die familiäre Anamnese erstellt werden, um Erkrankungen wie die Multiplen- Endokrinen- Neoplasien oder das VHL- Syndrom zu erkennen. Es ist zu beachten, dass, wie bereits erwähnt, nur ein Teil der Nebennierentumoren symptomatisch wird.

Nachfolgend werden laborchemische Tests zum Nachweis einer hormonellen Aktivität des Tumors durchgeführt. Immer ausgeschlossen werden müssen durch die Bestimmung der 24-h- Metanephrene im Sammelurin das okkulte Phäochromozytom, durch den Dexamethason-Hemmtest das subklinische Cushing- Syndrom sowie bei Patienten mit gleichzeitig vorliegender arterieller Hypertonie das Conn- Syndrom durch Bestimmung der Aldosteron-Renin- Ratio. Da Nebennierenkarzinome häufiger als Adenome Androgene sezernieren, wird empfohlen, als mögliche Marker immer auch das DHEAS (Dehydroepiandrosteronsulfat) und das Androstendion im Serum zu bestimmen, obwohl einige Arbeiten die Aussagekraft dieser Marker anzweifeln (Bencsik et al. 1996, Mantero et al. 1997, Bernini et al. 1998).

Der Nachweis bzw. Ausschluss einer endokrinologischen Aktivität der Tumoren ist insbesondere für das peri- und postoperative Management und das damit verbundene Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko von Relevanz. So bedarf beispielsweise ein Cortisol produzierender Tumor einer peri- und postoperativen Cortisolsubstitution, das Phäochromozytom einer suffizienten Alpha- Blockade. Außerdem stellt der Nachweis einer klinisch relevanten und durch die Nebenniere bedingten Hormonüberproduktion eine Indikation zur Adrenalektomie dar.

Hauptinstrumente in der Diagnostik von Nebennierentumoren sind die bildgebenden Verfahren. Anwendung finden die Sonographie, die Endosonographie, die

Computertomographie, die Magnetresonanztomographie sowie Nuklearmedizinische Verfahren.

Sonographisch sind regelmäßige Nebennieren transabdominell nicht darstellbar, nur vergrößerte Organe lassen sich erkennen. Eine Differentialdiagnostik hinsichtlich der Dignität ist mit der Sonographie nicht möglich, sodass sich immer eine invasivere Diagnostik anschließen muss. Aufgrund der weiten Verbreitung und der häufigen Anwendung kommt dem Ultraschall bei der Erstdiagnose von Raumforderungen an den Nebennieren eine besondere Bedeutung zu. Außerdem liegt der Wert der Sonographie in einer kostengünstigen, nicht invasiven Nachsorge von als benigne eingeschätzten Nebennierentumoren (Fontana et al. 1997).

Die Bedeutung der Nebennierenendosonographie liegt in der hochauflösenden Darstellung der Organe, Raumforderungen von wenigen Millimeter Größe können nachgewiesen werden. Außerdem ist es möglich, Malignitätskriterien wie eine Gefäßinfiltration oder locoregionäre Lymphknotenvergrößerungen darzustellen. Die Endosonographie findet zunehmend Eingang in die Routinediagnostik.

Verfahren der Wahl in der Diagnostik und Differentialdiagnostik von Nebennierentumoren sind allerdings die CT und die MRT. Mit beiden Verfahren ist es möglich, die Raumforderungen an den Nebennieren zu erkennen, sie hinsichtlich ihrer Größe, ihrer Homogenität sowie ihrem Wachstumsverhalten bezüglich Verdrängung oder Infiltration in die Nachbarstrukturen zu beurteilen.

Charakteristische Zeichen typischer Adenome in den Schnittbildverfahren sind die rundlich-ovaläre Form, die glatte Begrenzung und die homogene Struktur. In der nativen CT zeigen sie einen Dichtewert von weniger als 10 – 20 Hounsfield- Einheiten (HU). Nach Gabe von Kontrastmittel präsentieren sie ein mäßiges Enhancement, welches sie nicht unbedingt von anderen Läsionen unterscheidet (Szolar und Kammerhuber 1997, Pena et al. 2000, Caoili et al. 2002). Im MRT zeigen die fettreichen Adenome in der „chemical-shift“- Analyse eine deutliche Änderung der Signalintensität zwischen „in-phase“- und „out-off-phase“-Bildgebung, während nichtadenomtöse Strukturen diese Veränderungen weniger zeigen. Man muss betonen, dass auch Ausnahmen von diesen generellen Regeln beschrieben sind (Korobkin et al. 1996).

Bei den Karzinomen findet man sowohl in CT als auch MRT meist eine inhomogene Struktur aufgrund von Einblutungen oder Nekrosen, es lassen sich häufig Verkalkungen nachweisen. Dichtewerte größer 30HU gelten als malignomverdächtig. Nach Kontrastmittelgabe kommt es insbesondere in der Peripherie des Tumors zu einem inhomogenen Enhancement. In der MRT

zeigen die Karzinome in den T2- gewichteten Aufnahmen eine hohe Signalintensität. Kritisch anmerken muss man, dass diese klassischen Eigenschaften vor allem bei den großen, meist mit einer schlechten Prognose einhergehenden Karzinomen zu finden sind. Kleine bzw. in einem Frühstadium befindlichen Malignome sind mit den bildgebenden Verfahren häufig nicht zu finden oder nicht von anderen, in der Regel gutartigen Tumoren, unterscheidbar.

Phäochromozytome sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose meist bereits größer als 3cm (Manger et al. 1985). Sie zeigen mit zunehmender Größe regressive Veränderungen, selten sind Verkalkungen erkennbar (Dunnick und Korobkin 2002). Typisch sind Dichtewerte größer 10HU und ein starkes KM- Enhancement.

Werden sie in frühen Stadien entdeckt, imponieren Nebennierenmetastasen als kleine, homogen kontrastierte Läsionen und sind damit kaum von gutartigen Raumforderungen zu unterscheiden.

Aufgrund von regressiven Veränderungen kann die Abgrenzung vom Karzinom bei großen Myelolipomen erheblich erschwert sein.

Typisch für Zysten ist eine dünne, glatt begrenzte Wand, die 3mm nicht überschreiten sollte. Da Verkalkungen in der Wand auftreten können, ist die Abgrenzung zu zystenbildenden Karzinomen schwierig zu treffen.

Ähnlich ist es bei Hämorrhagien an der Nebenniere, auch sie können eigenständig oder im Rahmen von Malignomen entstehen.

In der Diagnostik von Nebennierentumoren haben sich nuklearmedizinische Verfahren etabliert. Zur Anwendung kommen die Norcholesterol- Szintigraphie bei Verdacht auf einen hormonaktiven Nebennierenrindentumor sowie die Meta- Iodo- Benzyl- Guanidin- (MIBG-) Szintigraphie bei Verdacht auf ein Phäochromozytom. Die Fluorodeoxyglucose- Positronen- Emissions- Tomographie (FDG- PET) kann in Zentren, in denen sie zur Verfügung steht, für die Aktivitäts- und Dignitätsbeurteilung von Inzidentalomen genutzt werden (Shulkin et al. 1993, Boland et al. 1995).

Als ein wichtig angesehenes Kriterium zur Dignitätsbeurteilung gilt neben den spezifischen radiologischen Kriterien die Tumorgöße. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich hinter einem zufällig an den Nebennieren entdeckten Tumor ein Nebennierenkarzinom verbirgt, nimmt mit steigender Größe des Befundes zu. So beträgt diese Wahrscheinlichkeit bei Tumoren mit einem Durchmesser kleiner 4cm etwa 2%, bei Raumforderungen zwischen 4 und 6 cm circa 6% und bei Inzidentalomen größer 6cm etwa 25% (NIH 2002, Mansmann et al. 2004).

Insgesamt kann man zu den radiologischen Verfahren sagen, dass die Nebennierentumoren, welche die klassischen Zeichen der jeweiligen Tumordifferentialdiagnose zeigen, sehr gut diagnostiziert und mithilfe von CT, MRT oder PET auch mit relativ hoher Sensitivität und Spezifität hinsichtlich ihrer Dignität eingeschätzt werden können (Honigschnabl et al. 2002). Grenzwertige Befunde, wie z.B. granulomatöse Entzündungen, fettarme Adenome, Phäochromozytome, kleine oder im Frühstadium befindliche Karzinome sind dagegen häufig nicht diagnostizierbar bzw. voneinander unterscheidbar (Lockhart et al. 2002). Außerdem berichten Autoren (Belldegrün et al. 1986, Cerfolio et al. 1993), dass die CT die Tumoren zwischen 20 – 47 % zu klein darstellt. Da man die Therapieentscheidung zum Großteil von der Tumorgroße abhängig macht, kann dies für den Patienten verheerende Folgen haben.

2.4.3. Feinnadelaspiration/ -biopsie

Derzeit indiziert ist dieses Verfahren, CT- oder Sonographie-gestützt, zum Ausschluss einer Nebennierenmetastase bei Patienten, die in ihrer Anamnese an einer malignen Erkrankung leiden und keine Anzeichen für weitere Metastasen haben (Saboorian et al. 1995, Wu et al. 1998).

Eine Kontraindikation dieser Untersuchung sind Phäochromozytome, sie müssen wegen der Gefahr der hypertensiven Krise laborchemisch ausgeschlossen werden.

Die Risiken eines solchen Verfahrens wurde in vielen retrospektiven Studien untersucht, die gefährliche Komplikation einer Stichkanalmetastase wurde in einer einzigen Untersuchung an 78 Patienten bei einem Patienten dargestellt (Mody et al. 1995). Andere Studien mit teilweise hohen Fallzahlen konnten hiervon nicht berichten (Welch et al. 1994, Lumachi et al. 2001).

Einige Autoren empfehlen aufgrund der radiologischen Schwierigkeiten, welche bei der Diagnostik kleinster Nebennierenkarzinome bestehen, eine Feinnadelaspirationsbiopsie (FNA) bei allen Nebennierentumoren größer 2cm durchzuführen (Lumachi et al. 2003). Da mit einer FNA, bei der man anhand der Zytologie die Dignität bestimmen muss, Malignität nicht sicher ausgeschlossen werden kann (kein Nachweis von Kapselüberschreitungen, oft kaum Zellunterschiede Adenom – Karzinom), wird dieses Verfahren in der Routinediagnostik nicht empfohlen.

Malignität sicherer bewerten kann die Feinnadelbiopsie, bei welcher ein Gewebezylinder entnommen wird. Leider gibt es, anders als bei Tumoren anderer Organe, bei den Nebennierentumoren mit den zur Verfügung stehenden histologischen und immunhistochemischen Verfahren große Probleme, die Dignität insbesondere der

grenzwertigen Befunde sicher zu bestimmen. Daher wird die Entnahme von Gewebe mithilfe einer Biopsie in der Standarddiagnostik abgelehnt.

2.4.3. Differentialdiagnose der Nebennierentumoren durch den Pathologen

Für den Pathologen ist es mitunter schwierig, im histologischen Schnittbild zwischen den einzelnen Tumoren der Nebennieren zu unterscheiden. So können Phäochromozytome den Nebennierenrindenkarzinomen sehr ähnlich sehen. Die Abgrenzung zwischen Karzinomen und Adenomen ist histologisch, besonders bei Karzinomen im Frühstadium, häufig kaum möglich. Um eine Unterscheidung zwischen gut- und bösartigen Befunden zu treffen, bedient man sich sogenannter Kriterienkataloge, die durch katamnestische Untersuchungen von Weiss et al. (Weiss 1984, Weiss et al. 1989), Hough et al. (Hough et al. 1979) und van Slooten et al. (van Slooten et al. 1985) erstellt wurden. Dabei werden Merkmale der Zell- und Kernstruktur, der Architektur sowie des Verhaltens zu Blutgefäßen und Kapsel, aber auch regressive Veränderungen gewertet, graduiert und zu einem Score addiert, der nach Überschreiten einer bestimmten Schwelle die Einstufung in ein Nebennierenkarzinom erfordert. Die Ergebnisse aller drei Schemata können gemittelt werden. Alle drei Autoren hatten relativ kurze Nachbeobachtungszeiten bei der Erstellung ihrer Scores, sodass die Aussagekraft dieser Kriterienkataloge limitiert ist.

Nur begrenzte Informationen zur Differenzierung der Dignität liefert die Immunhistochemie. Für ein Karzinom spricht vor allem eine Expression des Proliferationsmarkers Ki67 und der immunhistochemische Nachweis von p53. Chromogranin A ist spezifisch für neuroendokrine Tumoren und wird daher zum Nachweis von Nebennierenmarktumoren angewandt, eine Dignitätsbeurteilung ist nicht möglich. Zur Abgrenzung von Nebennierenmetastasen nutzt man immunhistologische Marker wie das epitheliale Membranantigen (Saeger et al. 2001).

Insgesamt muss man ähnlich wie bei den radiologischen Untersuchungsmöglichkeiten zusammenfassend sagen, dass die Mehrheit der zu diagnostizierenden Befunde durch den Pathologen sicher klassifiziert wird. Die für den Patienten hinsichtlich Prognoseverbesserung wichtigen grenzwertigen Befunde wie Karzinome in Frühstadien können allerdings nur selten mit den derzeit genutzten Methoden sicher erkannt werden.

2.5. Therapie der Nebennierentumoren

Entscheidend für die Auswahl der Therapieoptionen ist, ob sich eine hormonelle Aktivität des Nebennierentumors nachweisen lässt, und ob laut Diagnostik die Raumforderung als benigne oder maligne eingeschätzt wurde.

Zeigt der Patient in Anamnese und klinischer Untersuchung Zeichen einer hormonellen Aktivität des Tumors (Hypercortisolismus, Hyperaldosteronismus, Geschlechtshormon- oder Katecholaminexzess), welche sich laborchemisch nachweisen lassen, besteht eine Indikation zur Operation. Liegen keine Symptome vor, sollten zumindest biochemisch nachgewiesene Phäochromozytome aufgrund der Gefahr einer akut einsetzenden hypertensiven Krise operiert werden. Bei Patienten mit einer subklinischen, autonomen Glucocorticoidproduktion sind die Empfehlungen hinsichtlich der Indikation zur Operation oder zur engmaschigen Überwachung nicht eindeutig.

Klinisch und paraklinisch symptomatische wie unauffällige Nebennierentumoren werden nach den Kriterien Tumorgöße, spezifische radiologische Eigenschaften und Tumorgößenprogress in der Bildgebung hinsichtlich ihrer Dignität eingeschätzt.

Aufgrund der positiven Korrelation zwischen Tumorgöße und Malignitätsrisiko besteht bei einem Nebennierentumor über 6cm Durchmesser immer eine definitive Indikation zur Operation. Bei einem Durchmesser kleiner 4cm besteht keine Indikation, bei Befunden zwischen 4 – 6 cm muss individuell zwischen einem primär chirurgischen oder einem konservativ- abwartenden Vorgehen entschieden werden (abhängig von klinischem Zustand und Alter des Patienten). Allerdings gibt es Autoren, welche keine Operationsindikation erst ab einer Größe kleiner 3cm sehen (Glazer et al. 1982, Beldegrun et al. 1986).

Die Therapieentscheidung anhand der Größe eines Tumors zu treffen ist unbefriedigend, zumal bekannt ist, dass bis zu 10% der erkannten Nebennierenkarzinome zum Diagnosezeitpunkt kleiner als 4 bzw. 6 cm sind (Dackiw et al. 2001). Es besteht damit die Gefahr, gerade die Patienten mit einem Nebennierenkarzinom, welche eine relativ gute Prognose haben, nicht adäquat durch die operative Tumorentfernung zu therapieren.

Besteht initial keine Indikation zur Operation und entscheidet man sich für ein konservativ-abwartendes Procedere, wird derzeit zur Verlaufskontrolle im Abstand von 6 – 12 Monaten einmalig eine erneute Bildgebung mittels CT empfohlen (Gajraj und Young 1993). Andere Autoren berichten, dass auch eine sonographische Verlaufskontrolle ausreicht (Fontana et al.

1999). Bei fehlender Größenprogression erscheinen weitere Kontrollen nicht notwendig (NIH 2002). Zur endokrinologischen Verlaufskontrolle werden die Bestimmung der 24- h- Metanephrene im Sammelurin und ein Dexamethason- Hemmtest im jährlichen Abstand empfohlen. Bei fehlendem Nachweis einer Hormonaktivität sind nach 3 – 4 Jahren keine weiteren Kontrollen notwendig.

Wurde eine Exstirpation der Nebenniere durchgeführt und durch den Pathologen als benigne eingestuft, ist die Behandlung des Patienten abgeschlossen. Allerdings muss man bedenken, dass der Pathologe sehr häufig Probleme hat, den Nebennierentumor korrekt zu klassifizieren. Dementsprechend ist die Gefahr, dass er einen eigentlich malignen Befund, welcher weitere diagnostische und therapeutische Schritte nach sich ziehen würde, übersieht, gegeben.

In der Therapie des Nebennierenkarzinoms gibt es abhängig vom Tumorstadium verschiedene Optionen. Allerdings liegen bisher keine Phase- III- Studien vor, welche diese miteinander vergleichen. In den Stadien I – III ist die Adrenalektomie indiziert, da nur die vollständige Resektion des Tumors die Chance auf definitive Heilung bewahrt (trotzdem 5-JÜR bei vollständiger Resektion derzeit nur 32 – 48 % (Dackiw et al. 2001, Icard et al. 2001)). Aber auch wenn eine scheinbare R0- Resektion erreicht werden konnte, ist das Auftreten eines Lokalrezidivs oder von Metastasen sehr häufig. Insbesondere Tumoren ab Stadium III, ein hoher mitotischer Index oder intratumorale Einblutungen sind hierfür Risikofaktoren (Stojadinovic et al. 2002). Kann eine vollständige Tumorsektion nicht erreicht werden, besteht die Möglichkeit der operativen Tumorverkleinerung, allerdings liegt hier die mediane Überlebenszeit bei circa 12 Monaten (Zografos et al. 1994, Crucitti et al. 1996). Eine weitere Therapieoption ist die Strahlentherapie. Eingesetzt wird sie zur postoperativen Tumorbettachbestrahlung oder im Falle des Vorliegens von Knochenmetastasen. Zur medikamentösen Therapie stehen mehrere Substanzen zur Verfügung. Eingesetzt wird das Mitotane, eine selektiv adrenotoxische Substanz. Indiziert ist dies bei Vorliegen einer disseminierten Tumorerkrankung. Angewandt wird es auch zur adjuvanten Therapie bei R0- Resektion, scheint aber zu keiner Lebenszeitverlängerung zu führen (Icard et al. 2001). Auch der Einsatz von Zytostatika (Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin) wird genutzt, leicht verbesserte Therapieergebnisse wurden gezeigt (Berruti et al. 1998), Ansprechrate und -dauer waren allerdings insgesamt gering (Sidhu et al. 2003). Um die endokrine Aktivität eines nicht- operablen Nebennierenrindenkarzinoms zu kontrollieren, werden Substanzen wie Ketoconazol, Aminoglutethimid, Metapyron oder Etomidate eingesetzt.

Bei Vorliegen einer Nebennierenmetastase konnte bisher kein Vorteil einer Adrenalektomie für den Patienten nachgewiesen werden (NIH 2002).

Besteht der Verdacht auf ein Myelolipom, sollte dieses operativ entfernt werden, da Myelolipome durch zentrale Nekrosen oder Einblutungen akut symptomatisch werden können. Eine dann durchzuführende Notoperation wäre mit einer höheren Morbidität für den Patienten verbunden.

Während beim sporadischen unilateralen hormonaktiven Phäochromozytom wegen der Gefahr der Malignität eine unilaterale totale Adrenalektomie das Verfahren der Wahl darstellt, sollte bei Nachweis eines hereditären Phäochromozytoms eine organ- und funktionserhaltende subtotale Adrenalektomie durchgeführt werden.

Auf dem Gebiet der Nebennierenchirurgie sind in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt worden. So stehen für die ein- wie beidseitige Adrenalektomie neben offenen auch minimalinvasive Operationsverfahren mit retroperitonealen (dorsal, lateral) und transperitonealen Zugangswegen zur Verfügung. Sowohl die offene als auch die laparoskopische Adrenalektomie sind anerkannte Operationsverfahren, mit denen es außerdem möglich ist, in bestimmten Situationen partielle Adrenalektomien, bei denen ausschließlich das Tumorgewebe entfernt wird, durchzuführen. Da die laparoskopische Adrenalektomie perioperative Vorteile hat, wird sie in den meisten Fällen angewandt, bei Kontraindikationen (Voroperationen am Abdomen, Tumorgöße über 8 cm) sollte primär ein offenes anterior- transperitoneales oder lateral- bzw. posterior- retroperitoneales Vorgehen gewählt werden.

Trotz Fortschritten in allen verfügbaren therapeutischen Optionen ist die Prognose des Nebennierenkarzinoms weiterhin extrem schlecht, was insbesondere an der oftmals zu späten Diagnose oder aber an der nicht korrekten Einschätzung des malignen Potentials eines Nebennierentumors liegt.

2.6. Genetik der Nebennierentumoren

Wie bereits oben erwähnt, sind die Mechanismen der Vererbung und die zugrunde liegenden molekulargenetischen Veränderungen der hereditären Syndrome, welche mit der Ausbildung

von Nebennierentumoren einhergehen können, sehr gut untersucht. Für die sporadischen Nebennierentumoren gilt dies nicht, hier befindet sich die Erforschung der Tumorinitiation und Tumorprogression verursachenden genetischen Veränderungen noch in einem Anfangsstadium.

2.6.1. Genetik Nebennierentumor-assoziiierter hereditärer Syndrome

Es existieren wenige, sehr selten auftretende, aber doch in ihrer Genese gut untersuchte Nebennierentumor-assoziierte Syndrome. Dazu gehören z.B. das Li- Fraumeni- Syndrom, das Beckwith- Wiedemann- Syndrom oder die Hereditäre- Kongenitale- Hyperplasie, die mit Tumoren der Nebennierenrinde einhergehen können, sowie die mit Tumoren des Nebennierenmarkes assoziierten Syndrome Multiple- Endokrine- Neoplasie, Neurofibromatose und das Von- Hippel- Lindau- Syndrom.

2.6.1.1. Tumoren der Nebennierenrinde

Aufgrund einer Mutation im p53- Gen auf Chromosom 17 (17p13) (Malkin et al. 1990, Wagner et al. 1994) haben Patienten mit einem Li- Fraumeni- Syndrom bereits vor dem 30. Lebensjahr eine Prädisposition für verschiedenste Tumoren, vor allem Mammakarzinome, Hirntumoren, Lungenkarzinome, maligne Weichteiltumoren oder auch Leukämien. In einem Prozent aller Patienten mit einem Li- Fraumeni- Syndrom kommt es zum Auftreten von Nebennierenkarzinomen (Li und Fraumeni 1969). Die Erkrankung wird autosomal- dominant vererbt. Das bei dieser Erkrankung betroffene Tumorsuppressorgen p53 hat eine wichtige Funktion in der Regulation des Zellzyklus. Es wird als „Genomwächterprotein“ bezeichnet, da es bei Schädigung des Genmaterials einer Zelle deren Zellzyklus blockiert, bis der Schaden behoben ist, oder, wenn die Reparatur nicht mehr möglich ist, die Zelle in Apoptose schickt. p53 steht dabei in Interaktion mit Genen wie dem Mdm2, dem p21 und mit DNA-Reparatur- und Apoptosegenen. Bei verminderter Funktion des p53- Suppressorgens besteht die Gefahr einer Tumorentstehung und -progression.

Ebenfalls ein gehäuftes Vorkommen von Nebennierenkarzinomen findet man beim Beckwith- Wiedemann- Syndrom. Das autosomal- dominant vererbte Syndrom setzt sich zusammen aus den Symptomen Makroglossie, Gigantismus, Bauchwanddefekten, Hepatoblastomen, Wilms- Tumoren, Rhabdomyosarkomen und eben Nebennierenkarzinomen (Hoof et al. 1969). Als Ursache konnten Mutationen auf dem Chromosomenarm 11p15 gefunden werden.

Eine autosomal- rezessiv vererbte Erkrankung ist die Kongenitale- Adrenale- Hyperplasie. Durch eine Mutation in einem Gen in der Region 6p21.3, welches für das Enzym 21-

Hydroxalase kodiert, kommt es zu einer verminderten Sekretion von Kortisol, was eine konsekutive Erhöhung des ACTH- Spiegels zur Folge hat. Dies kann wiederum mit der Ausbildung ein- oder beidseitiger Nebennierenhyperplasien einhergehen.

Weiterhin bekannt sind hereditäre Erkrankungen, die mit einer hormonellen Nebennierenüberfunktion assoziiert sind, welche sekundär zur Vergrößerung der Nebennieren führen kann. Zu diesen Erkrankungen gehört z.B. das MEN- I- Syndrom, hier konnte ein Defekt in der Region eines Tumorsuppressorgens auf Chromosom 11 (11q13) gefunden werden (Beckers et al. 1992, Schussheim et al. 2001).

2.6.1.2. Tumoren des Nebennierenmarkes

Mit Tumoren des Nebennierenmarkes können die Multiple- Endokrine- Neoplasie (MEN) Typ2, das Von- Hippel- Lindau- Syndrom (VHL- Syndrom) sowie die Neurofibromatose- (NF-) Typ 1 einhergehen.

Bei MEN 2 ist eine Keimbahnmutation im RET- Protoonkogen in der chromosomalen Region 10q11 nachzuweisen (Mulligan et al. 1993), die zu einer Aktivierung eines Tyrosinkinaserzeptors führt. Es handelt sich um einen autosomal- dominanten Vererbungsmechanismus. Die MEN- 2- Phäochromozytome sind meist bilateral angelegt und gehen aus einer medullären Hyperplasie hervor (Schroder und Padberg 1991). Das MEN- 2- Syndrom setzt sich zusammen aus synchron oder metachron auftretenden Phäochromozytomen, einem primären Hyperparathyreoidismus und dem medullären Schilddrüsenkarzinom.

Beim VHL- Syndrom kommt es zu Ausbildung verschiedener Tumoren wie dem Nierenzellkarzinom, Hämangioblastomen des zentralen Nervensystems, Nieren-, Pankreas- oder Nebenhodenzysten und Phäochromozytomen. Als Ursache konnte eine Mutation auf Chromosom 3 (3p25/26) gefunden werden (Latif et al. 1993). Etwa 36% der Patienten mit dieser Alteration und VHL- Syndrom bilden ein Phäochromozytom aus (Vortmeyer et al. 2002).

Obwohl auch gelegentlich über sporadische medulläre Hyperplasien berichtet wurde, ist der Nachweis einer bilateralen medullären Hyperplasie in den meisten Fällen mit einer MEN- 2 oder mit einem VHL- Syndrom verbunden.

Bei der Neurofibromatose vom Typ 1 treten selten Phäochromozytome auf (nur ca. 2% aller NF-1 Patienten), daneben findet man Neurofibrome, charakteristische café- au- lait- Flecken und ZNS- Tumoren. Bekannt sind bei dieser Erkrankung auch zusammengesetzte Phäochromozytome, welche neben dem Phäochromozytomanteil als zweite Komponente ein

Neuroblastom, ein Ganglioneuroblastom, ein Ganglioneurom oder einen Anteil eines malignen peripheren Nervenscheidentumors (MPNST) enthalten (Franquemont et al. 1994). Gefunden wurde hier eine Mutation im NF- 1- Gen in der chromosomalen Region 17q11.2 (Xu et al. 1992), welches für das Protein Neurofibromin kodiert.

Aufgrund der gut erforschten Keimbahnmutationen ist es heutzutage möglich, bei Verdacht auf eine hereditäre Erkrankung diese mit einer genetischen Diagnostik nachzuweisen und die betroffenen Familien zu beraten und zu behandeln.

2.6.2. Genetik sporadischer Nebennierentumoren

Aufgrund der geringen Inzidenz insbesondere der Nebennierenkarzinome liegen zu diesem Thema sehr wenige Arbeiten mit meist geringen Fallzahlen vor. Es konnten verschiedene genetische Alterationen sowohl für Nebennierenrinden- als auch Nebennierenmarktumoren nachgewiesen werden. Es ist bisher allerdings nicht möglich, sie in einen Zusammenhang hinsichtlich der Tumorgenese und Tumorprogression zu bringen. Bisher konnten auch keine diagnostischen molekulargenetischen Marker gefunden werden, welche Aussagen zur Dignität eines Nebennierentumors erlauben.

2.6.2.1. Tumoren der Nebennierenrinde

Da sich diese Arbeit mit der genetischen Charakterisierung der Nebennierentumoren mittels Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) befasst, soll zu Anfang kurz auf die Ergebnisse der bisher publizierten Arbeiten zu diesem Thema eingegangen werden.

Die erste Studie, welche den Nebennierenrindentumor mittels CGH untersuchte, war eine Arbeit aus dem Jahre 1996 von Kjellman et al. an 22 Tumoren. Von den 14 Adenomen zeigten alle 12 Tumoren mit einer Größe kleiner 5cm keine, die zwei über 5cm großen Tumoren jeweils einen Verlust oder Zugewinn. Die Karzinome (Größenbereich 7 – 20 cm) zeigten Verluste auf den Chromosomen/ -armen 2, 11q und 17p (4 von 8 Tumoren) und Zugewinne auf den Chromosomen 4 und 5 (4 von 8 Tumoren) (Kjellman et al. 1996).

Eine zweite Arbeit von Zhao et al. untersuchte 41 Tumoren (6 Hyperplasien, 23 Adenome, 12 Karzinome), hier fanden sich bei zwei Hyperplasien Zugewinne auf Chromosomarm 17q, bei den Adenomen vor allem Gewinne auf den Chromosomenarmen 9q und 17q. Die Karzinome zeigten überwiegend Verluste, z.B. auf den Chromosomenarmen 1p, 2q, 3p, 3q, 6q, 9p und 11q, Zugewinne fanden sich auf den Chromosomenarmen 5q, 12q und 20q (Zhao et al. 1999).

In einer weiteren Arbeit zu diesem Thema von Dohna et al. wurden 7 Adenome und 13 Karzinome der Nebenniere untersucht. Ihre Ergebnisse decken sich mit denjenigen der anderen Autoren nicht. Als bisher einzige fanden sie mehr Zugewinne als Verluste. Tumoren kleiner 4cm zeigten keine genetischen Veränderungen in der CGH (Dohna et al. 2000).

Eine vierte Untersuchung von sporadischen Nebennierenrindentumoren mittels CGH stammt von Sidhu et al., die 18 benigne und 13 maligne Tumoren der Nebenniere untersuchten. Sie fanden in etwa gleicher Verteilung Gewinne und Verluste genetischen Materials. Sie stellten anhand ihrer Ergebnisse die Thesen auf, dass das Vorkommen von 4 oder mehr Veränderungen in einer CGH- gestützten Untersuchung suggestiv für einen malignen Nebennierenrindentumor ist, und dass aufgrund des häufigen Vorkommens eines Zugewinns auf Chromosom 4 die Aktivierung von Protoonkogenen auf diesem Chromosom ein frühes Ereignis in der Tumorgenese dieser Tumoren darstellt. Da sie einige Veränderungen des genetischen Materials, die sie bei den Karzinomen fanden, auch bei den Adenomen sahen, vermuten Sidhu et al. einen möglichen Übergang vom Adenom zum Karzinom (Sidhu et al. 2002).

Analysen bezüglich der Klonalität der Nebennierentumoren ergaben, dass Nebennierenkarzinome eher monoklonal, die gutartigen Befunde eher polyklonal sind (Beuschlein et al. 1994, Gicquel et al. 1994). Allerdings liegen hierzu sehr wenige Daten vor, eine Differenzierung der Dignität über die Klonalität der Tumore ist sicher nicht möglich.

Genetische Veränderungen, wie sie bei den hereditären Syndromen anzutreffen sind, könnten natürlich auch in die Genese sporadischer Nebennierenrindentumoren involviert sein. Aus diesem Grund wurden Nebennierenrindentumoren nach Alterationen der bekannten Gene für p53, IGF- 2, p57/KIP2, RAS und andere untersucht.

Für die in der Tumorentstehung häufig betroffene Genregion des p53 auf Chromosom 17 (17p13) zeigten die Untersuchungen von Ohgaki et al. 1993 und Reincke et al. 1994 in 20 bzw. 27 % der Karzinome eine genetische Alteration (Ohgaki et al. 1993, Reincke et al. 1994). Von einigen Autoren konnte ein Verlust der Heterozygotie (LOH) auf Chromosomarm 17p in bis zu 80% der Nebennierenrindenkarzinome nachgewiesen werden (Bornstein et al. 1999, Arola et al. 2000, Gicquel et al. 2001, Wachenfeld et al. 2001). Dies lässt die Vermutung zu, dass auch andere auf 17p lokalisierte Tumorsuppressorgene eine Rolle in der Tumorgenese der Nebennierenkarzinome spielen. Beispielhaft wären hier HIC- 1, CRK oder ABR zu nennen (Morris et al. 1995, Wales et al. 1995).

Eine paternale Isodisomie auf Chromosom 11 (11p15.5) mit Überexpression von IGF- 2 konnte bei sporadischen Karzinomen der Nebennierenrinde nachgewiesen werden (Gicquel et

al. 1997), man geht davon aus, dass es sich um einen entscheidenden Tumorprogressionsfaktor handelt (Sidhu et al. 2003). Des weiteren ließ sich für die Karzinome eine verminderte Expression von p57/KIP2 in der Region 11p15 erkennen (Liu et al. 1997).

Bei der Analyse von sporadischen Nebennierentumoren konnte ein Defekt in der chromosomalen Region 6p21, so wie er bei der hereditären Kongenitalen- Adrenalen-Hyperplasie auftritt, nicht nachgewiesen werden (Kjellman et al. 1999).

Kein vermehrtes Auftreten einer Alteration bei sporadischen Nebennierenrindentumoren fand sich für den Genlocus des MEN- 1- Genes auf Chromosom 11 (11q13), sodass diese Region in der Pathogenese der sporadischen Tumoren wahrscheinlich keine Rolle spielt (Heppner et al. 1999, Schulte et al. 1999, Schulte et al. 2000).

Auch die RAS- Familie war nicht vermehrt von Mutationen betroffen (Moul et al. 1993, Ohgaki et al. 1993).

Ein molekulargenetischer Mechanismus der Tumorentstehung ist die Reaktivierung der Telomerase in transformierten Zellen, einem Enzym, welches den physiologischen Alterungsprozess einer Zelle verhindern kann. Dieser Mechanismus konnte für die Nebennierentumoren nicht nachgewiesen werden (Hirano et al. 1998).

2.6.2.2. Tumoren des Nebennierenmarkes

CGH- gestützte Arbeiten, welche die sporadischen Phäochromozytome untersuchten, fanden überwiegend Verluste genetischen Materials. Besonders die Chromosomenarme 1p, 3q, 3p, 11p, 17p, 22q waren sehr häufig von Verlusten betroffen (Dannenberg et al. 2000, Edstrom et al. 2000, Lui et al. 2002). Es ist bisher unklar, wie diese Alterationen in die Prozesse der Tumorinitiation und Tumorprogression der Phäochromozytome involviert sind.

Dannenberg et al. 2000 vermuten anhand ihrer Ergebnisse, dass spezifische chromosomale Alterationen wie Verluste auf den Chromosomenarmen 1p, 3q, 6q und 17p sowie Zugewinne auf 9q und 17q in der Entwicklung der Phäochromozytome eine Rolle spielen. Der Verlust von Tumorsuppressorgenen auf 1p und 3q scheinen dabei frühe Ereignisse der Tumorgenese zu sein, der Verlust genetischen Materials auf den Chromosomenarmen 6q und 17p geht mit einer Progression zur Malignität einher. Es gibt allerdings noch keine Marker, die eine sichere Charakterisierung der Dignität von Phäochromozytomen erlauben (Dannenberg et al. 2000).

Verluste genetischen Materials auf Chromosomarm 1p traten in 80% aller sporadischen und MEN- 2 assoziierten Phäochromozytome auf, bei VHL assoziierten- dagegen nur in 15%,

sodass man mindestens zwei unterschiedliche Wege der Tumorgenese vermutet (Lui et al. 2002).

Nur bei einem kleinen Teil sporadischer Phäochromozytome fand man Mutationen in den für hereditäre Syndrome bekannten Genloci. Dies suggeriert, dass diese Gene keine entscheidende Rolle in der Tumorgenese der sporadischen Phäochromozytome spielen (Eng et al. 1995, Gutmann et al. 1995, van der Harst et al. 1998, Neumann et al. 2002).

Für das p16- Tumorsuppressorgen (Aguiar et al. 1996), das Protoonkogen c- mos (Eng et al. 1996), IGF- 2, RAS und andere in der Tumorentstehung typische Genloci konnten für die sporadischen Nebennierenmarktumoren keine Mutationen gehäuft nachgewiesen werden, auch eine vermehrte Telomeraseaktivität war nicht erkennbar.

Verluste der Heterozygotie fand man für die Chromosomenarme 1p, 3p, 11p, 17p und 22p, allerdings wurden meist sehr kleine Serien von Patienten untersucht (Moley et al. 1992, Tanaka et al. 1992, Vargas et al. 1997).

Ein nachgewiesener Zusammenhang besteht zwischen der Prognose des Neuroblastoms und dem Vorhandensein oder dem Verlust der Heterozygotie (LOH) in der chromosomalen Region 1p36. LOH ist kombiniert mit einer schlechten, kein LOH mit einer guten Prognose (Caron et al. 1996).

3. Ziele der Arbeit

Das derzeit limitierte Wissen über Ätiologie und Pathogenese der sporadischen Nebennierentumoren führt zu gravierenden Problemen in Diagnostik und Therapie dieser Raumforderungen. Es ist daher eine Pflicht für verschiedene Fachdisziplinen, die Nebennierentumoren vor dem Hintergrund der steigenden klinischen Bedeutung zu erforschen, um auf der Basis eines fundierten Wissens eine Verbesserung der Diagnostik, Therapie und Prognose zu erreichen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Nebennierentumoren hinsichtlich ihrer genetischen Eigenschaften zu charakterisieren und zu differenzieren.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche spezifischen genetischen Alterationen präsentieren Nebennierentumoren?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen der Anzahl genetischer Alterationen und der Dignität der Tumoren?
3. Gibt es eine Korrelation zwischen der Anzahl genetischer Alterationen und der Größe der Nebennierentumoren?
4. Lassen sich spezifische genetische Aberrationen in Korrelation zur Dignität nachweisen?
5. Lässt sich anhand der Ergebnisse die These einer Adenom – Karzinom – Sequenz für die Nebennierentumoren formulieren?
6. Kann man anhand der Ergebnisse ein Tumorprogressionsmodell für die Nebennierentumoren erstellen?
7. Wie heterogen sind die Nebennierentumoren hinsichtlich ihrer genetischen Veränderungen?

4. Material und Methode

4.1. Material

Aufgrund der relativ geringen Inzidenz der Nebennierentumoren ist es sehr schwierig, geeignetes Untersuchungsmaterial zu erhalten. Für die Untersuchung wurden Gewebeproben aus der Universität Bratislava / Slowakei und der Universität Jena retrospektiv aufgearbeitet. Die gefundenen Tumoren wurden durch zwei unabhängig arbeitende Pathologen nach den allgemein anerkannten Kriterien histopathologisch klassifiziert.

Insgesamt konnten 32 Tumoren der Nebenniere ausgewertet werden, es handelt sich um 27 Tumoren der Nebennierenrinde (3 noduläre Hyperplasien, 14 Adenome, 10 Karzinome) sowie um 5 Raumforderungen des Nebennierenmarkes.

Einer der Nebennierenrindentumoren konnte durch die Pathologen nicht sicher klassifiziert werden. Man entschloss sich, den Tumor in die Gruppe der Adenome zu setzen, eine sichere Differenzierung vom Karzinom mittels histologischer Begutachtung war allerdings nicht möglich. Dieser Tumor (Identifikationsnummer 17) wird in der Gruppe der Adenome ausgewertet. Tabelle 2 gibt einen Überblick über das untersuchte Nebennierentumormaterial.

Tabelle 2: Histologie, Anzahl und Größe (maximaler Durchmesser in mm) der untersuchten Tumoren, dazu Geschlecht und Alter (zum OP-Zeitpunkt in Jahre) der betroffenen Patienten.

Histologie	Anzahl Tumoren	Geschlecht w / m	Alter der Patienten (Mittel / Bereich)	Tumorgröße (Mittel / Bereich)
n. Hyperplasie	3	2/1	54,0 / 46-59	33,0 / 23-48
Adenom	14	6/8	50,9 / 26-65	37,6 / 16-70
Karzinom	10	7/3	47,7 / 19-64	94,7 / 42-150
Phäochromozytom	5	3/2	53,4 / 39-68	57,6 / 32-85

Bei vier Tumoren wurden Schnittpräparate aus unterschiedlichen Arealen der Raumforderung angefertigt, sodass es möglich war, die genetische Heterogenität dieser Tumoren zu untersuchen. Es handelt sich um die Adenome mit den Identifikationsnummern 6 (5 Areale) und 15 (3 Areale) sowie um die beiden Karzinome mit den Identifikationsnummern 21 (4 Areale) und 25 (2 Areale).

Tabelle 3 gibt einen detaillierten Überblick über alle in dieser Arbeit untersuchten Nebennierentumoren.

Tabelle 3: Darstellung aller untersuchten Nebennierentumoren, dazu Geschlecht, Alter der betroffenen Patienten (zum Operationszeitpunkt in Jahre), ergänzt durch die Größe (maximaler Durchmesser in Millimeter) der Tumoren und deren histopathologische Klassifikation.

Nummer	Geschlecht	Alter	Tumorgroße	Histologische Klassifikation
1	w	59	23	noduläre Hyperplasie
2	m	46	28	noduläre Hyperplasie
3	w	57	48	noduläre Hyperplasie
4	w	50	16	Adenom
5	m	52	20	Adenom
6	m	52	23	Adenom
7	m	57	27	Adenom
8	w	64	30	Adenom
9	m	63	32	Adenom
10	m	55	35	Adenom
11	w	26	35	Adenom
12	w	49	36	Adenom
13	m	55	36	Adenom
14	m	65	39	Adenom
15	w	49	63	Adenom
16	m	52	65	Adenom
17	w	39	70	Adenom
18	w	64	k.A.	Karzinom
19	w	56	42	Karzinom
20	w	63	50	Karzinom
21	w	39	68	Karzinom
22	w	45	80	Karzinom
23	m	58	100	Karzinom
24	w	19	100	Karzinom
25	w	61	120	Karzinom
26	m	49	140	Karzinom
27	m	23	150	Karzinom
28	w	52	32	Phäochromozytom
29	m	64	53	Phäochromozytom
30	w	39	55	Phäochromozytom
31	m	68	63	Phäochromozytom
32	w	44	85	Phäochromozytom

4.2. Methode

Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Das Verfahren der CGH (Comparative Genomic Hybridisation) ist eine molekularzytogenetische Screening- Methode, welche den Nachweis chromosomaler Imbalancen über das gesamte Genom ermöglicht. Dabei werden die detektierbaren Veränderungen entweder als DNA- Gewinn oder -Verlust klassifiziert. Erstmals beschrieben wurde dieses Verfahren von Kallioniemi et al., gefolgt von du Manoir et al. (Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993).

Als Untersuchungsmaterial kann sowohl frisch asserviertes als auch archiviertes, Formalin-fixiertes, Paraffin- eingebettetes Gewebe verwendet werden. Damit ist es mit dieser genetischen Untersuchung möglich, gesammeltes und über Jahre gelagertes Material retrospektiv aufzuarbeiten (Speicher et al. 1993, Isola et al. 1994). Dies ist bei Tumoren mit geringer Inzidenz wie den Nebennierenkarzinomen von großer Bedeutung.

In Verbindung mit der DOP- PCR ist der DNA- Gehalt einzelner Zellen für eine Analyse ausreichend, eine Zellkultivierung ist nicht nötig (Weiss et al. 1999, Harada et al. 2000). Damit können Probleme der Zellkultivierung und der Auswertung komplexer Karyotypen bei der Chromosomenanalyse solider Tumoren umgangen werden (du Manoir et al. 1993, Kallioniemi et al. 1994, Storkel et al. 1996).

Die CGH, mit welcher das gesamte Genom und nicht nur einzelne Genorte betrachtet werden, ermöglicht relativ schnell einen Überblick über chromosomale Regionen, welche in Pathogenese und Progression von Tumoren eine Rolle spielen. Damit stellt die CGH insbesondere für den genetisch eher spärlich charakterisierten Nebennierentumor eine geeignete Untersuchungsmethode dar. Lassen sich einzelne Chromosomen oder Chromosomenabschnitte ermitteln, welche häufig von Alterationen betroffen sind, kann dies auf in den entsprechenden Regionen liegende Tumorsuppressorgene oder Protoonkogene hinweisen, deren Funktionsverlust bzw. Aktivierung einen Einfluss auf Tumorinitiation und Tumorprogression haben.

Durch die Spezifizierung sowohl der Art als auch der Anzahl genetischer Veränderungen ermöglicht die CGH eine genetische Tumorklassifikation, die vor allem für histologisch nur schwer klassifizierbare Tumoren von großem Nutzen sein kann (Petersen et al. 1996).

Die CGH ist ebenfalls geeignet, einen Maßstab für die Progression eines Tumors im Sinne eines Tumorgradings zu bieten. Des weiteren ist es mittels CGH möglich, Aussagen zur Prognose einer Tumorerkrankung zu machen (Isola et al. 1995, Moch et al. 1996, Gronwald et al. 1997), Metastasen einem Primärtumor zuzuordnen (Weiss et al. 2003) oder Präneoplasien hinsichtlich bekannter genetischer Alterationen der jeweiligen Tumorentität zu untersuchen (Heselmeyer et al. 1996).

Zu den Limitationen der CGH zählt in erster Linie die Sensitivität. Diese ist abhängig von der Größe der veränderten genetischen Region. Alterationen auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene sind detektierbar. Punktmutationen, Translokationen, Inversionen oder das Phänomen des genomischen Imprinting sind mit einer CGH nicht nachweisbar. Die Sensitivität kann durch Polyklonalität und Heterogenität des Tumors sowie durch Kontamination mit gesunden Zellen eingeschränkt sein. Mindestens 60% der untersuchten Zellen müssen eine entsprechenden Veränderung aufweisen, um diese nachweisen zu können. Das Auflösungsvermögen der CGH wird mit etwa 10 – 20 Mb angegeben, was bedeutet, dass Zugewinne und Verluste von Chromosomen und / oder -abschnitten bis zu einer minimalen Größe von 10 – 20 Mb erfasst werden (Joos et al. 1993, Bentz et al. 1998). Daher wird die CGH als eine Art DNA-Screening-Untersuchung angesehen, welche mit ihren Ergebnissen sensibleren molekulargenetischen Untersuchungstechniken wie FISH (Fluoreszenz- In- Situ-Hybridization) und DNA- Sequenzierungstechniken orientierende Vorarbeiten leisten kann.

Neue Entwicklungen wie die Array- CGH oder Matrix- CGH mit DNA- Chips ermöglichen eine Analyse von Regionen und Genen mit hoher Auflösung und Sensitivität. Diese Verfahren werden in der molekular-zytogenetischen Diagnostik der Zukunft einen hohen Stellenwert einnehmen (Solinas-Toldo et al. 1997, Wessendorf et al. 2002, Snijders et al. 2003, Veltman et al. 2003, Inazawa et al. 2004)

Grundlage der CGH ist eine konkurrierende Hybridisierung von Tumor- DNA und Normal-DNA auf Metaphaseplatten aus normalen Zellen. Um diese Hybridisierung durchführen zu können, müssen sowohl Tumor- DNA als auch Normal- DNA isoliert, amplifiziert und markiert werden.

4.2.1. Isolierung der DNA

Von allen zu untersuchenden Tumoren werden Schnittpräparate angefertigt, mit HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt, von den Pathologen beurteilt und histopathologisch klassifiziert. Die Areale, welche mehr als 90% Tumorzellen enthalten, werden markiert.

Zur Isolation der Tumor- DNA werden die markierten Areale vom Objektträger entfernt. Die Isolation erfolgt mit einem kommerziellen Kit (Quiagen®) unter Einsatz der Proteinase K.

Die Normal- DNA wird von Lymphozyten aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen.

4.2.2. DOP- PCR

Da aus den dünnen Gewebeschnitten häufig nur geringe Mengen DNA isoliert werden, muss die gewonnene DNA amplifiziert werden. Dazu wird eine Variante der Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) genutzt, die DOP- PCR (Degenerate- Oligonucleotid- Primed- PCR). Mit der DOP- PCR, welche von Telenius et al. 1992 entwickelt wurde, ist eine schnelle und effiziente Vermehrung des Genoms möglich (Telenius et al. 1992).

Als Primer werden Oligonukleotide mit partiell degenerierter Sequenz eingesetzt. Diese ermöglichen ein Priming an multiplen, gleichmäßig verteilten Stellen des Genoms, sodass die DNA- Vermehrung simultan an verschiedenen Startpunkten beginnen kann. Die ersten Zyklen der DOP- PCR werden bei niedriger Temperatur durchlaufen. Hierbei ist ein Überschuss des Enzyms ThermoSequenase notwendig. Da dieses Enzym eine hohe Thermolabilität besitzt, muss es in jedem der ersten 8 Zyklen zugegeben werden. Da dadurch für die Proben das Kontaminationsrisiko steigt, wird bei jeder DOP- PCR stets eine Negativkontrolle mitgeführt.

Die folgenden Zyklen der DOP- PCR werden bei höheren Temperaturen unter Einsatz des Enzyms TaqPolymerase durchlaufen. Neben der Primerkonzentration ist insbesondere die Konzentration der TaqPolymerase für die Effizienz der DNA- Vermehrung verantwortlich. Unter optimalen Bedingungen können bis zu 7µg DNA pro 50µl Reaktion erzielt werden. Die in der DOP- PCR gewonnenen DNA- Fragmente haben Längen von 100 – 2000 Basenpaaren (Speicher et al. 1993, Harada et al. 2000, Hirose et al. 2001).

Nachfolgend erscheint eine detaillierte Darstellung über die Edukte und den zeitlichen Ablauf einer DOP- PCR.

Lösung A:

Anzahl Proben	2	3	4	5	6	12
H ₂ O in µl	10,125	13,5	16,875	20,25	23,625	47,25
Puffer in µl	1,8	2,4	3,0	3,6	4,2	8,4
DOP-Primer in µl	1,875	2,5	3,125	3,75	4,375	8,75
dNTPs in µl	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	5,6

Lösung B: Enzym- Mix für PCR- Zyklen mit niedriger Temperatur, pro Ansatz sind 0,24µl für jeden der 8 Zyklen notwendig.

Anzahl Proben	2	3	4	5	6	12
Dilutionspuffer in µl	5,25	7	10,5	12,25	14	28
SequenaseThermo in µl	0,75	1,0	1,5	1,75	2,0	4,0

Lösung C: Mix für PCR- Zyklen mit hoher Temperatur ohne Enzym, pro Ansatz sind 45µl notwendig.

Anzahl Proben	2	3	4	5	6	12
H ₂ O in µl	70,45	102,67	130,05	157,43	191,66	383,32
Puffer in µl	10	15	19	23	28	56
dNTPs in µl	8,8	13,2	16,72	20,24	24,64	49,28
DOP- Primer in µl	2,75	4,13	5,23	6,33	7,7	15,4
MgCl ₂ in µl	10	15	19	23	28	56

Lösung D: Enzym- Mix für PCR- Zyklen mit hoher Temperatur, pro Ansatz sind 5µl nötig.

Anzahl Proben	2	3	4	5	6	12
H ₂ O in µl	8,75	12,25	16,1	19,6	23,1	46,2
Puffer in µl	1,25	1,75	2,3	2,8	3,3	6,6
MgCl ₂ in µl	1,25	1,75	2,3	2,8	3,3	6,6
TaqPolymerase in µl	1,25	1,75	2,3	2,8	3,3	6,6

Nach DNA- Isolation Transfer der Proben (0,1 – 1 µg DNA in 0,5 – 2 µl Lösung) in jeweils 5µl der Lösung A, nun Transfer der Proben in Thermocycler mit beheiztem Deckel. Im Thermocycler werden folgende Schritte mit niedriger und hoher Temperatur unter Zugabe der Lösungen B, C und D durchlaufen:

	Temperatur	Zeit	
1	96 °C	5min	
2	30 °C	2min20s	hier pro Ansatz 0,24µl Lösung B hinzugeben
3	37 °C	2min	
4	95°C	1min	
5	7x Wiederholung ab Schritt 2 (=8 Zyklen)		
6	30 °C	2min20s	hier pro Ansatz 45µl Lösung C hinzugeben
7	95 °C	1min	
8	56 °C	2min20s	hier pro Ansatz 5µl Lösung D hinzugeben
9	72 °C	2min	
10	56 °C	1min	
11	94 °C	1min	
12	72 °C	2min	
13	31x Wiederholung ab Schritt 10 (=32 Zyklen)		
14	72 °C	10min	
15	4 °C	bis Probenentnahme	

4.2.3. Markierung der DNA

Um eine Beurteilung der Bindung von Tumor- DNA und Normal- DNA nach der Hybridisierung an Metaphasechromosomen durchführen zu können, müssen Tumor- und Normal- DNA in einer weiteren PCR markiert werden. Hierzu stehen eine direkte und eine indirekte Methode zur Verfügung. Während bei der direkten Variante Fluoreszenzfarbstoff-tragende Nukleotide während der PCR in die DNA eingebaut werden, erfolgt bei der indirekten Methode ein Einbau von Oligonukleotiden, an welche Markermoleküle wie Biotin oder Digoxigenin gekoppelt sind. Erst in einem weiteren Arbeitsschritt im Anschluss an die Hybridisierung werden an diese Markermoleküle Fluorochrom- tragende Moleküle gebunden (Larramendy et al. 1998, Wilkens et al. 2002). Alle Arbeitsschritte nach der Markierung müssen in dunkler Umgebung stattfinden, da sich sonst die Fluoreszenzsignale abschwächen. Daher ist der möglichst späte Einbau der Farbstoffe, so wie er bei der indirekten Methode geschieht, von Vorteil. Ein weiterer Vorteil der indirekten Methode liegt darin, dass man die Signale der Farbstoffe durch eine weitere Reaktion mit Fluorochrom- tragenden Molekülen verstärken kann, ohne dabei die Intensitätsverhältnisse zu verfälschen. Beide Varianten der DNA- Markierung gelten in der Literatur als etabliert, für diese Arbeit wird die insgesamt weniger störanfällige indirekte Markierung gewählt.

Nach der Markierung wird die DNA mit Hilfe von SpinRad- Columns® der Firma BioRad gereinigt, nicht eingebaute Oligonukleotide, Primer und kleine DNA- Fragmente werden entfernt. Anschließend erfolgt eine Messung der DNA- Konzentration.

Es folgt die Darstellung der Edukte und des zeitlichen Ablaufs der indirekten Markierung der Tumor- bzw. Normal- DNA.

Lösung A:

Anzahl Proben	1	2	4	6	8	10	12
H ₂ O in µl	10,08	25,2	45,36	65,52	85,68	105,8	126
AmpliTaqpuffer in µl	2	5	9	13	17	21	25
dNTPs label in µl	2	5	9	13	17	21	25
Biotin-dUTP in µl	2	5	9	13	17	21	25
DOP-Primer in µl	1	2,5	4,5	6,5	8,5	10,5	12,5
MgCl ₂ in µl	0,8	2,0	3,6	5,2	6,8	8,4	10,0
AmpliTaqpuffer in µl	0,8	2,0	3,6	5,2	6,8	8,4	10,0

Lösung B:

Anzahl Proben	1	2	4	6	8	10	12
H ₂ O in µl	11,08	27,7	49,86	72,02	94,18	116,4	138,5
AmpliTaqpuffer in µl	2	5	9	13	17	21	25
dNTPs label in µl	2	5	9	13	17	21	25
DIG-dUTP in µl	1	2,5	4,5	6,5	8,5	10,5	12,5
DOP-Primer in µl	1	2,5	4,5	6,5	8,5	10,5	12,5
MgCl ₂ in µl	0,8	2,0	3,6	5,2	6,8	8,4	10,0
AmpliTaqpuffer in µl	0,8	2,0	3,6	5,2	6,8	8,4	10,0

Transfer von 2µl DOP- PCR- Produkt der Tumor- DNA in 18µl Lösung A und 2µl DOP- PCR- Produkt der Normal- DNA in 18µl Lösung B. Transfer der Proben in Thermocycler mit beheiztem Deckel, hier werden die folgenden Schritte durchlaufen:

Temperatur	Zeit
1 95 °C	3min
2 94 °C	1min
3 56 °C	1min
4 72 °C	2min
5 19x Wiederholung ab Schritt 2 (=20 Zyklen)	
6 72 °C	5min
7 4 °C	bis Probenentnahme

4.2.4. Hybridisierung

Es werden jeweils 1µg der unterschiedlich markierten Tumor- DNA und Normal- DNA gemischt, denaturiert und für 2 – 4 Tage bei 37°C auf Metaphasechromosomen, deren DNA ebenfalls denaturiert wurde, hybridisiert. Wichtig ist die Zugabe von Cot-1-DNA, welche unspezifische Bindungen an hochrepetitiven Sequenzen wie Zentromerregionen oder p-Armen akrozentrischer Chromosomen unterdrückt (Weiss et al. 1999, Jeuken et al. 2002). Da diese Blockade mit Cot-1-DNA nicht vollständig ist und interindividuelle Polymorphismen in diesen Regionen vorliegen, sollten solche Regionen, ebenso wie Regionen mit sehr geringer Fluoreszenzintensität (z.B. Telomere) nur bedingt interpretiert oder aus der Analyse ausgeschlossen werden (Kirchhoff et al. 1997).

Es folgt eine Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte der Hybridisierung:

1. 1µg Tumor- DNA, 1µg Normal- DNA, 50µl Cot-1-DNA, 2Vol. Ethanol in ein Reaktionsgefäß geben, mischen, bei -70°C für 30min lagern
2. Probe bei 14000rpm für 10min zentrifugieren, Überstand verwerfen, 500µl 70%iges Ethanol dazu, bei 14000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, anschließend 15 – 30min lufttrocknen
3. in 7µl deionisiertem Formamid und 7µl Mastermix für 30min bei 37°C lösen
4. für 5min in 70°C- heißem Wasserbad denaturieren, dann für 5min in -20°C
5. 30min bei 37°C vorinkubieren
6. Objektträger vorbereiten: für 2min in 70°C heißem 70%igem Formamid denaturieren, anschließend je 2min in 70%, 85% und absoluten Ethanol, dann lufttrocknen
7. Probe auf halben Objektträger geben, zudeckeln und mit Fixogum verschließen
8. in feuchter Kammer bei 37°C für 2 – 4 Tage hybridisieren

4.2.5. Detektion

Da in dieser Arbeit die Methode der indirekten DNA- Markierung angewandt wird, muss nun noch die Anbindung von Fluorochrom- tragenden Molekülen erfolgen. An das in die Tumor- DNA eingebaute Biotin- Oligonukleotid bindet kovalent Avidin, an welches der grüne Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt ist. Die Markierung der Normal- DNA erfolgt mit Anti- Digoxigenin- Antikörpern, die mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin verkoppelt sind. Um die Chromosomen anhand ihres spezifischen Bandenmusters identifizieren zu können, erfolgt eine Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI (4,6- Diamidino-2-phenyl-indol).

Es folgt die Darstellung der Arbeitsschritte der Detektion:

1. Objektträger aus feuchter Kammer nehmen, Deckgläschen entfernen, Objektträger für 10min in 50%-igem Formamid bei 42°C waschen
2. für 10min in 2xSSC bei 42°C waschen
3. für 2min in 4xSSC bei Raumtemperatur waschen
4. 100µl 3%BSA/4xSSC/Tween auf Objektträger geben, zudeckeln, bei 37°C für 20min in feuchter Kammer inkubieren
5. 1µl Avidin- FITC (Verdünnung 1:500) und 50µl Anti- Digoxigenin- Rhodamin (Verdünnung 1:10) in 500µl 3%BSA/4xSSC/Tween geben, gut mischen und 100µl der Lösung auf Objektträger geben, zudeckeln, Objektträger in feuchte Kammer, bei 37°C für 30min inkubieren
6. 2x 5min in 4xSSC/Tween in dunkler Umgebung waschen
7. 20µl DAPI- Antifade auf Objektträger geben, mit Deckgläschen zudeckeln und in dunkler Umgebung aufbewahren

4.2.6. Auswertung

Mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2® der Firma Zeiss werden Metaphaseplatten gesucht. Geeignete Metaphaseplatten zeichnen sich durch Vollzähligkeit, wenige Überlappungen und gleichmäßige Anfärbung der Chromosomen aus.

Um eine quantifizierbare Aussage zu ermöglichen, erfolgt die Auswertung der Fluoreszenzbilder über eine CCD- (charged coupled device-) Kamera. Sie kodiert und quantifiziert das Fluoreszenzsignal als Graustufenbild. Weiterhin erfolgt die Aufnahme der Fluoreszenzbilder nicht simultan, sondern mittels spezieller Filter seriell für jedes Fluorochrom einzeln.

Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzbilder erfolgt mit dem Bildanalyse- Programm ISIS® (in situ imaging systems) der Firma Metasystems. Um Rauschsignale zu unterdrücken und damit fehlerhafte Resultate zu vermeiden, werden pro Fall mindestens 15 Metaphaseplatten ausgewertet. Die Chromosomen werden getrennt und anschließend anhand ihres spezifischen Bandenmusters sortiert. Beschädigte, mit Artefakten überlagerte oder sich überlappende Chromosomen werden von der Auswertung ausgeschlossen.

Das Computerprogramm errechnet das mittlere Fluoreszenzprofil entlang eines jeden Chromosoms. Es ermittelt dabei keine absoluten Intensitätswerte, sondern das Verhältnis von grünem und rotem Fluoreszenzsignal der gebundenen Tumor- DNA bzw. Normal- DNA. Kommt es zu Verlusten genetischen Materials beim Tumor, überwiegt in der betroffenen

Region das rote Fluoreszenzsignal der Normal- DNA. Ist der Tumor dagegen von Zugewinnen genetischen Materials in einer bestimmten Region betroffen, wird dementsprechend das grüne Fluoreszenzsignal überwiegen. Liegen keine Alterationen in der Tumor- DNA vor, beträgt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten 1,0. Würden alle Zellen eines Tumors die gleiche genetische Veränderung einer bestimmten Region tragen, würde sich der Wert für die Fluoreszenzintensitäten bei Zugewinnen genetischen Materials um 0,5 auf 1,5 erhöhen, für Verluste um 0,5 auf 0,5 vermindern. Da diese Zustände sehr unwahrscheinlich sind, hat man Schwellenwerte von 1,2 und 0,8 für den Nachweis einer Aberration festgelegt (du Manoir et al. 1993, Roth et al. 1996).

Die Abbildungen 1 – 3 stellen den Ablauf der Auswertung am Beispiel des Nebennierenkarzinoms mit der Nummer 27 bildlich dar.

Mittels CCD- Kamera erfolgt die serielle Aufnahme der Fluoreszenzbilder der markierten Tumor- DNA (Farbstoff FITC) und der Normal- DNA (Farbstoff Rhodamin). Die Aufnahmen der Fluoreszenzbilder einer Metaphase werden durch das Computerprogramm übereinander gelegt (Abbildung 1).

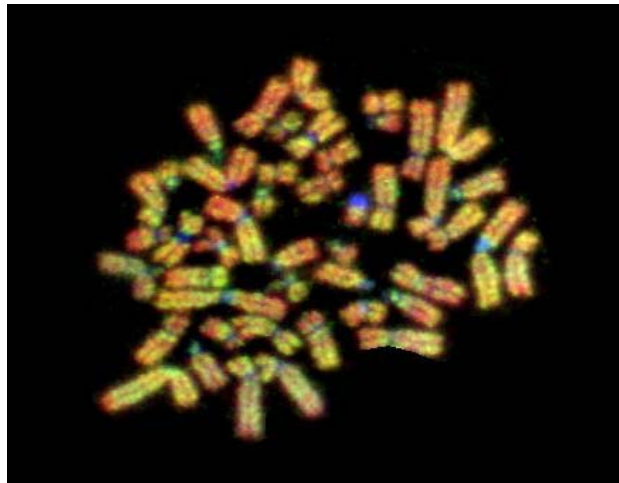


Abbildung 1: Fluoreszenzbild einer Metaphase für das Nebennierenkarzinom Nummer 27.

Die Chromosomen der Metaphase werden getrennt und in ein Karyogramm sortiert. Schon hier kann man an einigen Chromosomen ein Überwiegen des grünen (12p) oder des roten Fluoreszenzsignals (3p, 12q, 14q, 18q) erkennen (Abbildung 2).

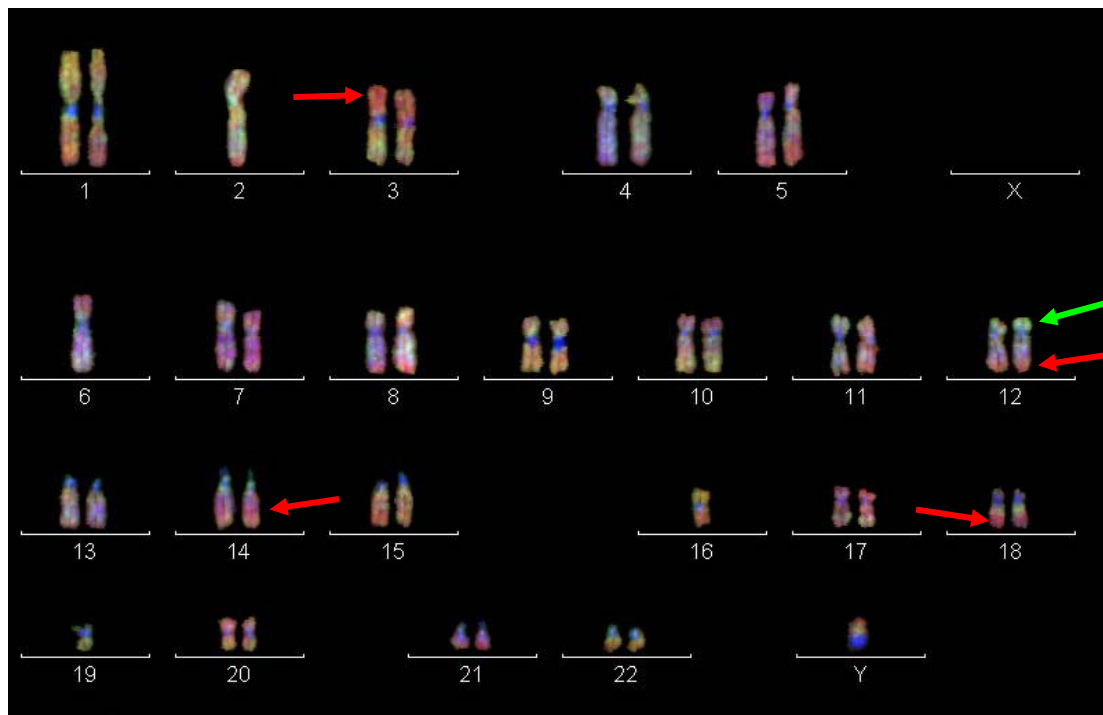


Abbildung 2: Karyogramm einer Metaphase des Nebennierenkarzinoms Nummer 27. Der grüne Pfeil markiert ein deutlich erkennbares Überwiegen des grünen, die roten Pfeile ein Überwiegen des roten Fluoreszenzsignals an den Chromosomen 3, 12, 14 und 18.

Mindestens 15 Metaphasen werden pro Tumor aufgenommen und bearbeitet. Das Computerprogramm ermittelt die Fluoreszenzintensitäten aller ausgewerteten Metaphasen und erstellt ein mittleres Fluoreszenzprofil für den untersuchten Tumor. Entsprechend der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse kann man nun Zugewinne (Überschreiten des Schwellenwertes von 1,2 (grüne Grenzlinie)) oder Verluste (Unterschreiten des Schwellenwertes von 0,8 (rote Grenzlinie)) genetischen Materials an der Tumor- DNA im Vergleich zur Normal- DNA ermitteln (Abbildung 3).

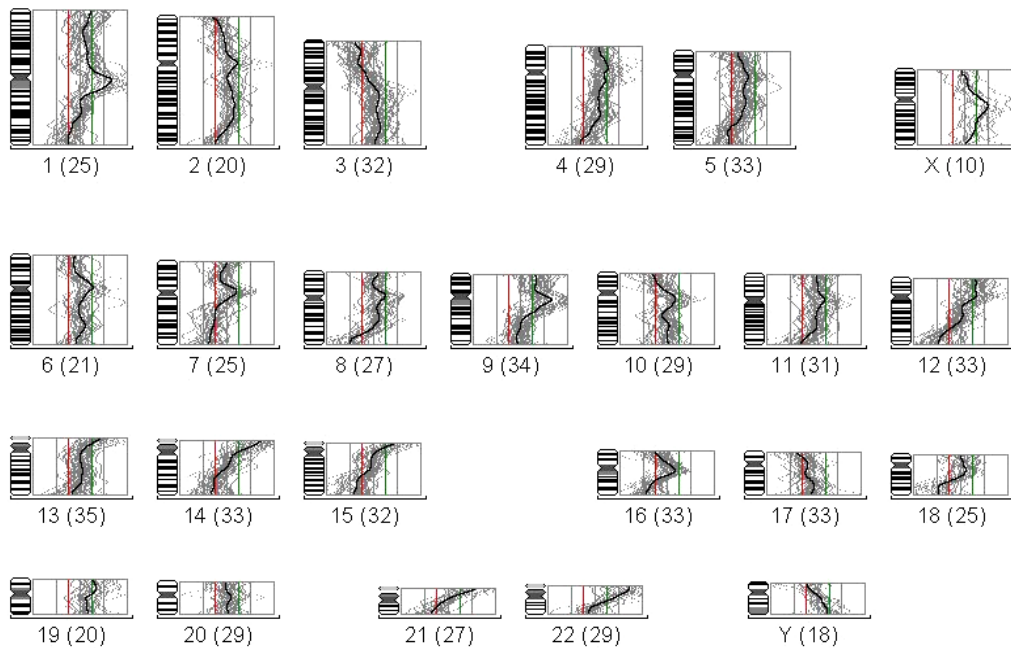


Abbildung 3: Darstellung des mittleren Fluoreszenzprofils für das Nebennierenkarzinom Nummer 27.

Im Falle des dargestellten Nebennierenkarzinoms lassen sich Zugewinne auf den Chromosomenarmen 5p, 9p, 12p und Verluste auf den Chromosomenarmen 1q, 3p, 7q, 10p, 12q, 14q, 15q, 16q und 18q erkennen.

4.2.7. Statistik

In dieser Arbeit wurden zwei Zusammenhänge mittels statistischer Berechnungen untersucht. Zum einen sollte ermittelt werden, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl genetischer Alterationen zwischen gut- und bösartigen Tumoren der Nebennieren gibt. Hierzu wurde der Wilcoxon- Mann- Whitney- Test eingesetzt, als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,01$ festgelegt. Des Weiteren wurde überprüft, ob zwischen der Anzahl genetischer Veränderungen und der Größe des Tumors eine Abhängigkeit besteht, hierzu wurde zwischen beiden Variablen der Korrelationskoeffizient nach Pearson errechnet. Ein Korrelationskoeffizient von 1 entspräche einer direkten, ein Wert von -1 einer indirekten Abhängigkeit der untersuchten Variablen. Ein Korrelationskoeffizient von 0 bedeutet, dass keine Abhängigkeit zwischen den untersuchten Variablen besteht.

5. Ergebnisse

Getrennt betrachten muss man die Ergebnisse der Nebennierenrindentumoren noduläre Hyperplasie, Adenom und Karzinom von den Ergebnissen der Nebennierenmarktumoren, da die jeweiligen Ursprungsgewebe dieser beiden Raumforderungen unterschiedlich embryologisch entstehen.

5.1. Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Dignität des Tumors

Alterationen des genetischen Materials fanden sich bei zwei der drei (66,6%) nodulären Hyperplasien, bei den Adenomen konnten bei 4 der 14 Tumoren (28,6%) genetische Veränderungen ermittelt werden. Demgegenüber präsentierten die Karzinome der Nebennierenrinde in 100% (10/10) Zugewinne oder Verluste genetischen Materials.

Bezieht man in die Berechnung der mittleren Anzahl genetisch alterierter Chromosomen pro Tumor nur die Tumoren ein, welche Veränderungen des genetischen Materials präsentierten, findet sich ein deutlicher Unterschied zwischen gut- und bösartigen Tumoren (noduläre Hyperplasie 1,5; Adenome 3,0; Karzinome 8,7). Schließt man den fraglich klassifizierten Tumor (Tumoridentifikationsnummer 17) aus dieser Berechnung aus, wird der Unterschied zwischen den beiden Dignitäten noch deutlicher, dann zeigen die nodulären Hyperplasien im Durchschnitt 1,5, die sicher klassifizierten Adenome 1,67 und die Karzinome 8,7 alterierte Chromosomen pro Tumor.

Betrachtet man den Bereich, in welchem sich die Anzahl der Chromosomen pro Tumor mit Veränderungen bewegt, erkennt man, dass es eine Überschneidung zwischen den Adenomen und Karzinomen gibt (0-7 vs. 6-12). Schließt man den fraglich klassifizierten Tumor aus der Gruppe der Adenome aus, präsentieren die Adenome einen Bereich von 0 – 3 veränderten Chromosomen pro Tumor.

Mit Hilfe des Wilcoxon- Mann- Whitney- Tests konnte ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Dignitäten bezüglich der Anzahl genetischer Alterationen ermittelt werden ($p < 0,001$).

Die Tumoren des Nebennierenmarkes zeigten in 100% (5/5) genetische Veränderungen. Der Bereich lag dabei zwischen minimal 4 und maximal 12 Chromosomen mit genetischen Alterationen pro Tumor, im Mittel bedeutet dies, dass 7,2 Chromosomen pro Nebennierenmarktumor Alterationen präsentierten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl der Nebennierentumoren mit genetischen Alterationen sowie Anzahl der Chromosomen pro Tumor mit Veränderungen (Bereich und Mittel).

	Anzahl Tumoren		Anzahl Chromosomen	
Histologie	mit genetischen Alterationen	mit genetischen Alterationen in %	mit genetischen Alterationen (Bereich)	mit genetischen Alterationen (Mittel)
Hyperplasie	2/3	66	0-2	1,5
Adenom	4/14	28,5	0-7	3,0
Karzinom	10/10	100	6-12	8,7
Phäochromozytom	5/5	100	4-12	7,2

5.2. Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Größe des Tumors

Die größte noduläre Hyperplasie (48mm) zeigte ein, die kleinste (23mm) kein Chromosom mit Veränderungen, der Tumor mit 28mm Größe präsentierte zwei alterierte Chromosomen.

In der Gruppe der Adenome zeigte keine der Raumforderungen kleiner 30mm Aberrationen des genetischen Materials, die Tumoren zwischen 30 und 40 mm zeigten maximal ein Chromosom mit Veränderungen, die größten Adenome (63 und 65 mm) präsentierten 1 – 3 veränderte Chromosomen. Bei dem nicht sicher klassifizierbaren Tumor mit einem maximalen Durchmesser von 7cm fanden sich 7 chromosomale Veränderungen.

Bei den 9 Karzinomen der Nebennierenrinde, bei denen eine Größenangabe gemacht wurde, konnten zwischen 6 – 12 Chromosomen mit Alterationen ermittelt werden, eine Abhängigkeit von der Tumorgroße lässt sich dabei kaum erkennen. Dies konnte mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson auch objektiviert werden (siehe unten). Das Karzinom ohne Größenangabe präsentierte 7 alterierte Chromosomen (Abbildung 4).

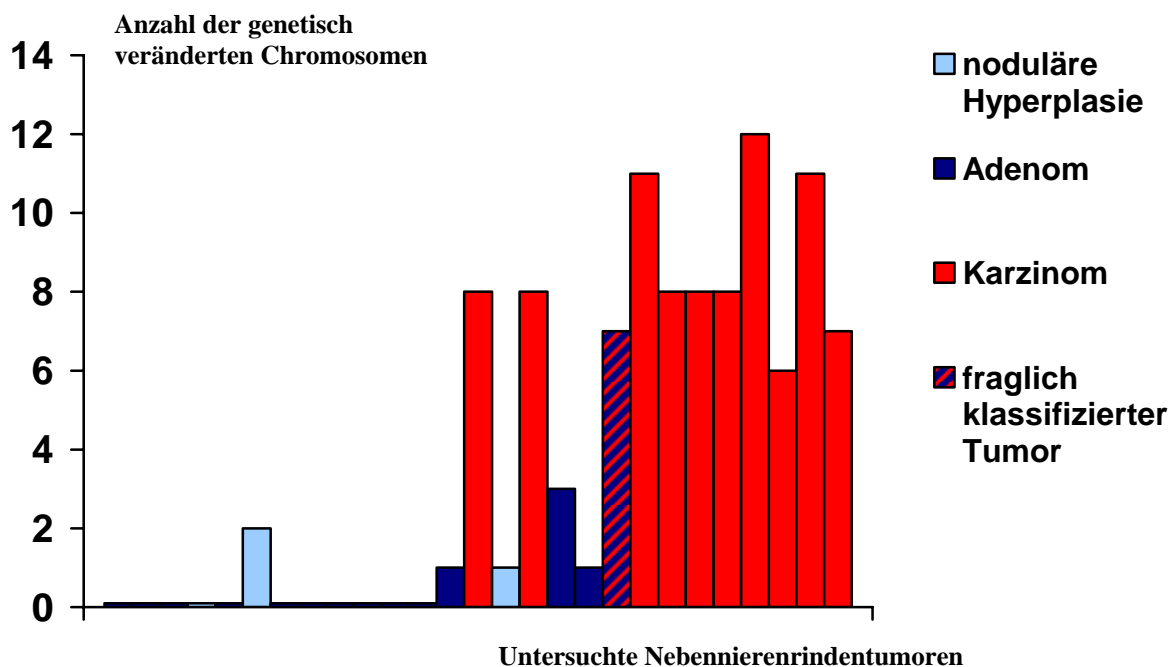


Abbildung 4: Diese Abbildung zeigt die Anzahl alterierter Chromosomen für alle untersuchten Nebennierenrindentumoren, der Größe nach geordnet, mit dem kleinsten Tumor beginnend, das Karzinom ohne Größenangabe ist rechts angesetzt.

Schließt man alle untersuchten Nebennierenrindentumoren ein, beträgt der Korrelationskoeffizient nach Pearson für die Abhängigkeit zwischen der Anzahl genetischer Veränderungen und der Größe des Tumors 0,797; unterteilt man die Tumoren in gut- und bösartige, erhält man für die sicher klassifizierten benignen Raumforderungen einen Wert von 0,639; für die Karzinome einen Wert von 0,262.

Bei den Tumoren des Nebennierenmarkes zeigte der mit 85mm größte Tumor mit 12 alterierten Chromosomen auch die meisten Veränderungen seines genetischen Materials, die Phäochromozytome zwischen 32 und 63 mm präsentierten zwischen 4 und 9 Veränderungen, der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt 0,601. Nimmt man den größten Tumor aus der Berechnung des Korrelationskoeffizienten heraus, zeigt sich eine negative Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Größe des Tumors (Koeffizient = -0,163) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Histologie und Größe (maximaler Durchmesser) der Nebennierentumoren, dazu Gesamtanzahl der veränderten Chromosomen pro Tumor; der mit einem Sternchen* gekennzeichnete Tumor ist die histologisch nicht sicher klassifizierbare Raumforderung.

Histologie	Größe in mm	Anzahl alterierter Chromosomen	Histologie	Größe in mm	Anzahl alterierter Chromosomen
Hyperplasie	23	0	Karzinom	k.A.	7
Hyperplasie	28	2	Karzinom	42	8
Hyperplasie	48	1	Karzinom	50	8
			Karzinom	70	11
Adenom	16	0	Karzinom	80	8
Adenom	20	0	Karzinom	100	8
Adenom	23	0	Karzinom	100	8
Adenom	27	0	Karzinom	120	12
Adenom	30	0	Karzinom	140	6
Adenom	32	0	Karzinom	150	11
Adenom	35	0			
Adenom	35	0	Phäochromozytom	32	6
Adenom	36	0	Phäochromozytom	53	5
Adenom	36	0	Phäochromozytom	55	9
Adenom	39	1	Phäochromozytom	63	4
Adenom	63	3	Phäochromozytom	85	12
Adenom	65	1			
Adenom*	70	7			

5.3. Spezifische chromosomale Veränderungen der Nebennierentumoren

Es ließen sich einige spezifische chromosomale Veränderungen nachweisen. Sowohl bei den benignen als auch malignen Befunden traten Verluste genetischen Materials weitaus häufiger auf als Zugewinne, bei den Karzinomen war das Verhältnis etwa 3:1 (75:25 %), bei den benignen Befunden etwa 2:1 (64:36 %) (Abbildung 5).

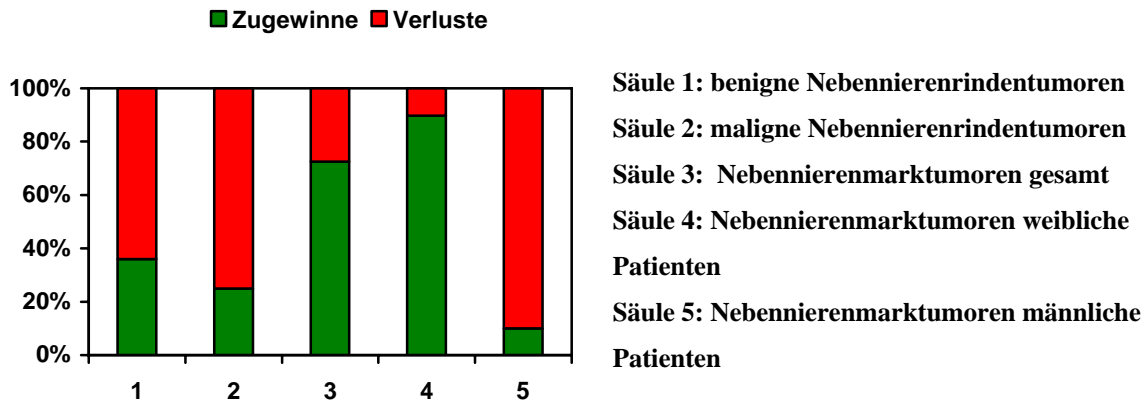


Abbildung 5: Darstellung des Verhältnisses Zugewinne zu Verluste genetischen Materials.

Eine noduläre Hyperplasie präsentierte jeweils einen Gewinn (Chromosomarm 9p) und einen Verlust (21q), eine zweite noduläre Hyperplasie zeigte einen Gewinn (9q), die dritte Hyperplasie zeigte keine genetischen Veränderungen.

Bei den Adenomen traten Zugewinne genetischen Materials nur vereinzelt auf, die chromosomale Region 9p war bei einem der sicher klassifizierten Adenome betroffen. Es fand sich keine chromosomale Region, welche vermehrt Verluste zeigte (3p, 5q, 11p, 14q jeweils einmal betroffen). Der unsicher klassifizierte Tumor zeigte einen Zugewinn auf 18p, Verluste präsentierte er in den chromosomalen Regionen 1p, 4q, 7q, 8p, 10q und 13q.

Alle Karzinome zeigten Verluste, nur 4 der 10 Karzinome präsentierten daneben auch Zugewinne genetischen Materials. Im Mittel fanden sich 2,0 Chromosomen pro Karzinom mit Zugewinnen im Vergleich zu 6,9 Chromosomen pro Karzinom mit Verlusten. Einige Chromosomen waren dabei vermehrt betroffen. Gehäuft Verluste fanden sich auf den Chromosomen/-armen 1p (50%), 1q (40%), 3/3p (70%), 4/4q (30%), 5/5q (30%), 6p (40%), 6q (60%), 7q (30%), 9p (30%), 9q (30%), 10q (30%), 11/11p (30%), 13q (40%), 14q (30%), 15q (30%) und 18q (70%). Die Chromosomen/-arme 2p, 2q, 7p, 8, 10p, 12q, 16p, 16q, 17/17p, 22 und das X-Chromosom waren in 10 oder 20 % aller Karzinome von Verlusten genetischen Materials betroffen. Die vereinzelt aufgetretenen Zugewinne fanden sich gehäuft auf 4q (20%), 5p (20%), 5q (20%), 7/7q (30%), 9p (20%) und 16 (20%), Zugewinne in den chromosomalen Regionen 1p, 3q, 6q, 10p, 12p, 13q, 14q und 18p traten bei jeweils einem Tumor auf (Abbildung 6).

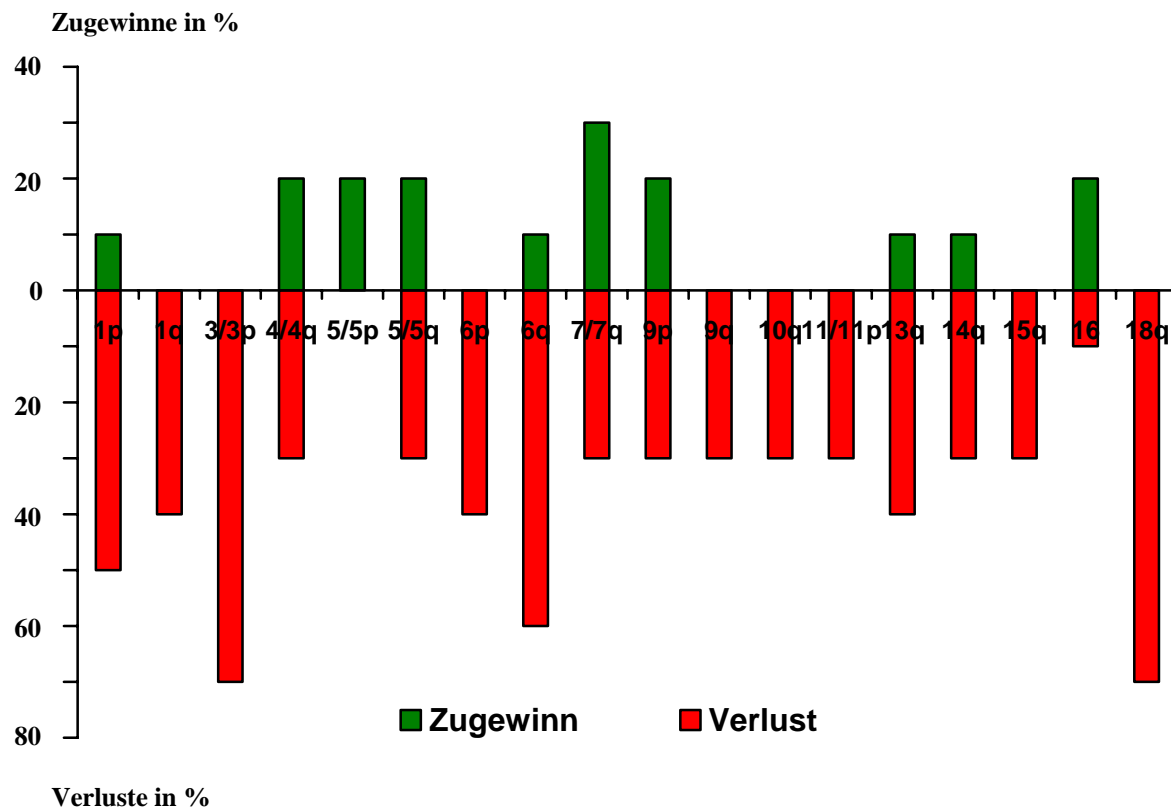


Abbildung 6: Dargestellt sind die häufigen genetischen Veränderungen der Karzinome in Prozent.

Aus Abbildung 6 kann man entnehmen, dass insbesondere die Verluste auf Chromosom/-arm 1p, 1q, 3/3p, 6p, 6q, 9q, 10q, 11/11p, 13q, 14q, 15q und 18q sowie der Zugewinn auf 5/5p entscheidende Rollen in der Genese und Progression der Nebennierenkarzinome spielen.

Alle von uns untersuchten 5 Nebennierenmarktumoren präsentierten genetische Alterationen. Dabei traten Zugewinne weitaus häufiger auf als Verluste, das Verhältnis betrug etwa 3:1 (72,5:27,5%). Interessant ist, dass man dabei zwischen den Geschlechtern deutliche Unterschiede erkennen kann. Während die drei untersuchten Raumforderungen der weiblichen Patienten (Tumoridentifikationsnummern 28, 30, 32) weitaus mehr Zugewinne als Verluste präsentierten, zeigten die beiden Tumoren der männlichen Patienten (29, 31) nur einen bzw. keinen Zugewinn genetischen Materials (Abbildung 5).

Betrachtet man die spezifischen chromosomalen Aberrationen der Nebennierenmarktumoren lässt sich erkennen, dass die beiden Tumoren der männlichen Patienten (29, 31) nahezu identische Ergebnisse lieferten. So fanden sich bei beiden Patienten Verluste in den chromosomalen Regionen 1p, 3q, 17p, dazu kamen bei jeweils einem Patienten ein Verlust auf Chromosomarm 6q und ein Verlust auf 8p sowie bei einem Patienten der Zugewinn auf

Chromosomarm 16p. Zwei der bei den weiblichen Patienten (28, 30) untersuchten Tumoren präsentierten ebenfalls nahezu identische Ergebnisse. So fanden wir bei diesen beiden Tumoren ausschließlich Zugewinne genetischen Materials, betroffen waren bei beiden Patientinnen die Chromosomen/-arme 5/5q, 12, 16, 20 und X, bei dem größeren dieser beiden Tumoren kamen noch Zugewinne auf den Chromosomen 4, 7, 10 und 21 dazu, der kleinere Tumor präsentierte gesondert einen Zugewinn auf 8q. Der dritte und größte Tumor des Nebennierenmarkes (32) zeigte wie die beiden anderen Tumoren der weiblichen Patienten mehr Zugewinne als Verluste genetischen Materials, gleich waren die Zugewinne auf den Chromosomen 12, 20 und X. Der Verlust auf 6q zeigte sich auch bei einem Tumor eines männlichen Patienten (29). Ansonsten präsentierte diese größte Raumforderung des Nebennierenmarkes Zugewinne auf den Chromosomen/-armen 1q, 6p, 7, 8p, 9p, 14p, 17q und 18 sowie Verluste in den chromosomalen Regionen 2q und 14q (Tabelle 6).

Tabelle 6: spezifische genetische Alterationen der untersuchten Nebennierentumoren mit Histologie, Nummer des untersuchten Tumors und Anzahl der von Veränderungen betroffenen Chromosomen, der mit einem Sternchen* gekennzeichnete Tumor ist die histologisch nicht sicher klassifizierbare Raumforderung. Fortsetzung dieser Tabelle auf Seite 52.

Histologie	Nummer	Zugewinn (Chromosom)	Verlust (Chromosom)	Anzahl Chromo- somen mit Alteration
Hyperplasie	1	-	-	0
Hyperplasie	2	9p	21q	2
Hyperplasie	3	9q	-	1
Adenom	4	-	-	0
Adenom	5	-	-	0
Adenom	6	-	-	0
Adenom	7	-	-	0
Adenom	8	-	-	0
Adenom	9	-	-	0
Adenom	10	-	-	0
Adenom	11	-	-	0
Adenom	12	-	-	0
Adenom	13	-	-	0
Adenom	14	-	3p14pter	1
Adenom	15	-	5q31qter, 11p, 14q21qter	3
Adenom	16	9p	-	1
Adenom*	17	18p	1p, 4q31.2qter, 7q31qter, 8p, 10q24qter, 13q33qter	7

Histologie	Nummer	Zugewinn (Chromosom)	Verlust (Chromosom)	Anzahl Chromo- somen mit Alteration
Karzinom	18	-	1p, 2q, 3p, 4, 6q, 13q, 18q	7
Karzinom	19	-	1, 4, 5, 9, 10q11.2q23q, 13q, 16, 18q	8
Karzinom	20	7, 16	1, 3, 6, 10, 11, 18q	8
Karzinom	21	-	1p, 3, 5q23qter, 6q, 7p, 11/11p, 13q, 14q23qter, 15q23qter, 17, 18q	11
Karzinom	22	-	1, 2p, 3, 6, 8, 9, 11, 18q	8
Karzinom	23	4q, 5, 7, 14q, 16	6p, 9q, 22qter	8
Karzinom	24	-	3p, 6q, 7q, 9p, 13q, 14q, 17p, 18q	8
Karzinom	25	1p33p35, 6q, 7q, 10p, 13q31qter, 18p	2q, 3p, 4q, 5q, 10q, 15q, Xp	12
Karzinom	26	3q, 4q, 5q, 9p	7, 8	6
Karzinom	27	5pterq23, 9p, 12p	1q31qter, 3p12.pter, 7q, 10p, 12q21qter, 14q23qter, 15q21qter, 16q, 18q	11
Phäochromo- zytom	28	5q, 8q, 12, 16, 20, X	-	6
Phäochromo- zytom	29	16p	1p, 3q, 6q, 17p	5
Phäochromo- zytom	30	4, 5, 7, 10, 12, 16, 20, 21, X	-	9
Phäochromo- zytom	31	-	1p, 3q, 8p, 17p	4
Phäochromo- zytom	32	1q, 6p, 7, 8p, 9p, 12, 14p, 17q, 18, 20, X	2q, 6q, 14q	12

5.4. Vergleich der spezifischen chromosomalen Aberrationen zwischen gut- und bösartigen Befunden

Bis auf den Zugewinn auf Chromosomarm 9q und den Verlust auf Chromosomarm 21q fanden sich alle bei den als gutartig eingeschätzten Tumoren ermittelten genetischen Veränderungen auch in der Gruppe der Karzinome, dies entspricht einem Prozentanteil von etwa 86%. Alle genetischen Alterationen der sicher klassifizierten Adenome und des fraglich klassifizierten Tumors waren bei den Karzinomen zu finden.

Die bei den benignen Tumoren ermittelten genetischen Aberrationen waren in der Regel häufige Befunde bei den bösartigen Nebennierenrindentumoren, einzelne Alterationen waren in bis zu 70% der Karzinome nachweisbar (Abbildung 7).

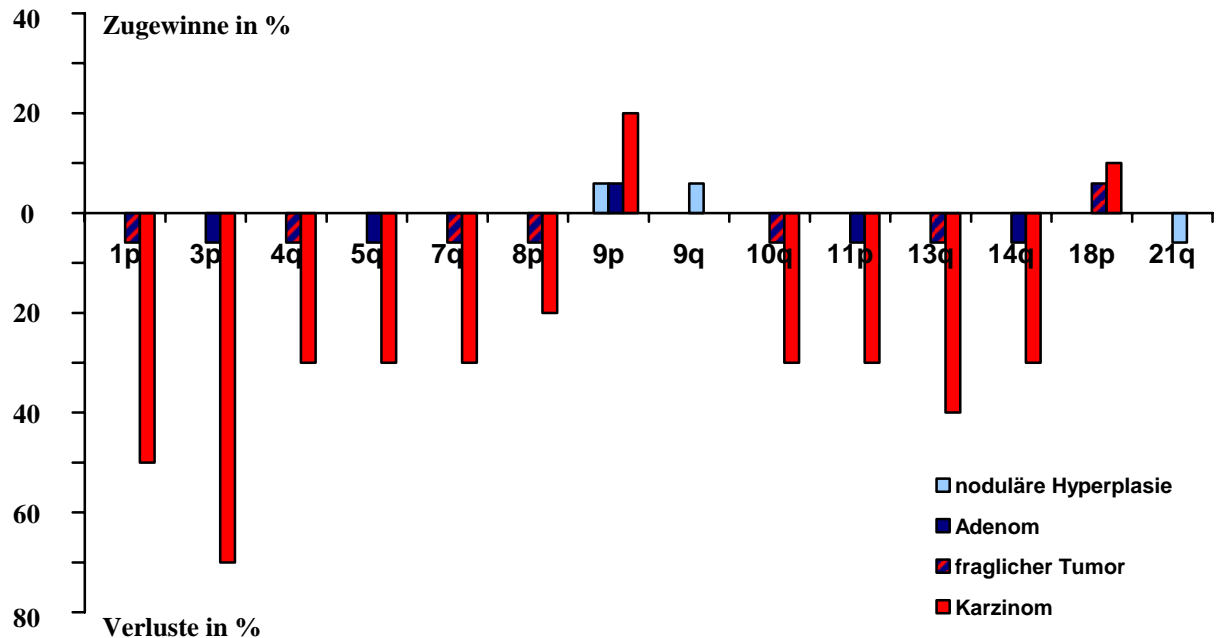


Abbildung 7: Darstellung der Anzahl der Zugewinne und Verluste in Prozent für noduläre Hyperplasie, Adenome, den fraglich klassifizierten Tumor und Karzinome; ausgewählt sind die chromosomalen Regionen, welche in der Gruppe der gutartig klassifizierten Tumoren genetische Veränderungen zeigten.

Als Beispiele für in dieser Untersuchung erzielte typische Ergebnisse sind in den Abbildungen 8 und 9 die Fluoreszenzprofile eines Adenoms (Nummer 12, keine genetischen Alterationen) und eines Karzinoms (Nummer 27, Zugewinn 5p, 9p, 12p, Verlust 1q, 3p, 7q, 10p, 12q, 14q, 15q, 16q, 18q) gegenübergestellt.

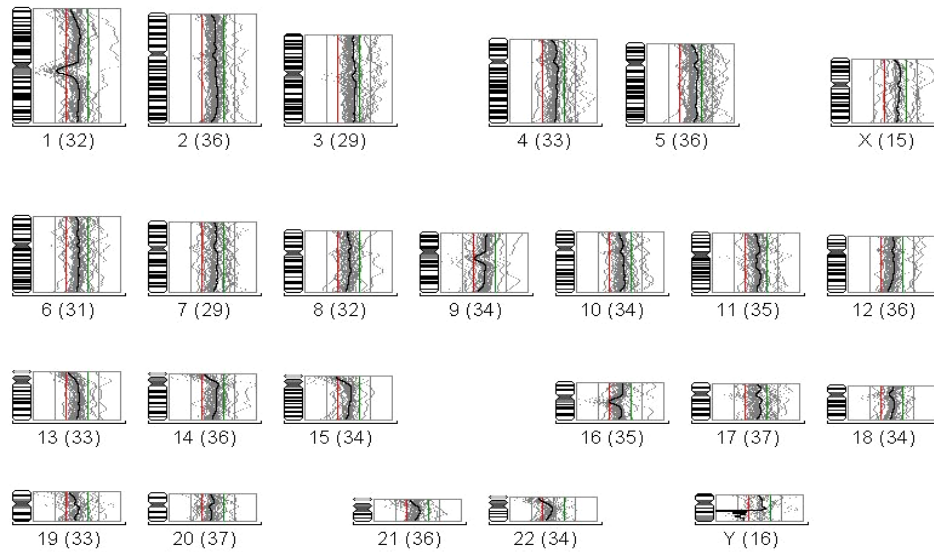


Abbildung 8: Mittleres Fluoreszenzprofil des Nebennierenadenoms Nummer 12.

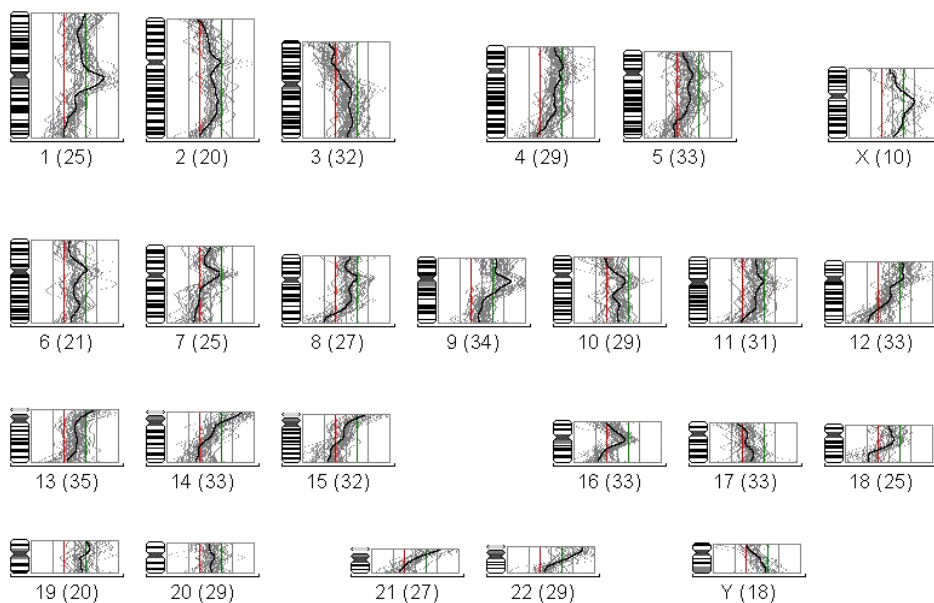


Abbildung 9: Mittleres Fluoreszenzprofil des Nebennierenkarzinoms Nummer 27.

5.5. Genetische Heterogenität der Nebennierentumoren

Bei 4 Tumoren war es möglich, unterschiedliche Areale der Raumforderung hinsichtlich genetischer Veränderungen zu untersuchen, es handelt sich um die Adenome mit den Tumoridentifikationsnummern 6 (5 Areale) und 15 (3 Areale) sowie um die beiden Karzinome mit den Identifikationsnummern 21 (4 Areale) und 25 (2 Areale).

Die Ergebnisse aus fünf untersuchten Lokalisationen des Adenoms 6 stimmen zu 100% überein, in keinem Areal fanden wir genetische Alterationen.

Das Adenom 15 wurde an 3 Stellen untersucht, zwei Areale (B, C) präsentierten jeweils eine (11p), das dritte Areal (A) drei chromosomale Regionen (5q, 11p, 14q) mit Alterationen.

Die bösartige Raumforderung mit der Identifikationsnummer 21 wurde an vier Stellen genetisch untersucht, es fanden sich zwischen 6 und 10 Chromosomen pro Schnittpräparat, welche Aberrationen zeigten. Die Chromosomen/-arme 1p, 3, 6/6q, 13q und 17/17q waren in allen vier Arealen betroffen, die Chromosomen/-arme 11/11p, 14q und 18q in drei Lokalisationen.

Karzinom 25 präsentierte in den zwei untersuchten Arealen der Raumforderung nahezu übereinstimmende Ergebnisse, beide Areale zeigten 11 veränderte Chromosomen, die Alterationen Zugewinn 1p, 7q, 10p, 13q und Verlust 2q, 3p, 4q, 5q, 15q, Xp waren sowohl in Areal A als auch Areal B zu finden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Raumforderungen, welche an verschiedenen Arealen genetisch untersucht wurden, dazu Histologie, Chromosomen mit Zugewinnen und Verlusten und Anzahl der von Veränderungen betroffenen Chromosomen pro Areal.

Histologie	Nr.	Areal	Zugewinn	Verlust	Anzahl alterierter Chromosomen
Adenom	6	A – E	-	-	-
Adenom	15	A	-	5q31qter, 11p, 14q21qter	3
		B	-	11p	1
		C	-	11p	1
Karzinom	21	A	-	1p, 3, 6q, 11, 13q, 17	6
		B	-	1p, 3, 6q, 7p, 11p, 13q, 14q23qter, 15q23qter, 17q, 18q	10
		C	-	1p, 3, 5q23qter, 6q, 11, 13q, 14q23qter, 17, 18q	9
		D	-	1p, 3, 6, 13q, 14q23qter, 15q, 17q, 18q	8
Karzinom	25	A	1p33p35, 7q, 10p, 13q31qter, 18p	2q, 3p, 4q, 5q, 15q, Xp	11
		B	1p34p35, 6q, 7q, 10p, 13q31qter	2q, 3p, 4q, 5q, 10q, 15q, Xp	11

6. Diskussion

Die von uns erzielten Ergebnisse können zum einen die bisher bekannten Daten genetischer Untersuchungen in einigen Punkten erhärten, zum anderen wurden aber auch neue genetische Alterationen ermittelt, welche in der Tumorgenese und Tumorprogression der Nebennierenraumforderungen eine wichtige Rolle spielen.

6.1. Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Dignität des Tumors

Eine enge Korrelation ließ sich zwischen der Dignität des Nebennierentumors und dem Vorkommen von genetischen Aberrationen nachweisen. Während nur etwa ein Drittel (4/14) der Adenome und zwei Drittel (2/3) der nodulären Hyperplasien genetische Veränderungen zeigten, war dies bei allen 10 Karzinomen (100%) der Fall. Beeindruckend ist dabei insbesondere die Anzahl der von Veränderungen betroffenen Chromosomen pro Tumor. Bezieht man nur die Tumoren in die Berechnung der mittleren Anzahl genetisch alterierter Chromosomen pro Tumor ein, welche Veränderungen des genetischen Materials präsentierten, ließen sich eindeutige Unterschiede zwischen gut- und bösartigen Befunden finden (noduläre Hyperplasie 1,5; Adenome 3,0; Karzinome 8,7 alterierte Chromosomen pro Tumor). Schließt man den nicht sicher klassifizierten Tumor in dieser Berechnung aus der Gruppe der Adenome aus, wird dieser Unterschied zwischen den beiden Dignitäten noch deutlicher (noduläre Hyperplasie 1,5; Adenome 1,67; Karzinome 8,7 alterierte Chromosomen pro Tumor). Diese Ergebnisse sind sehr gut mit den bisher publizierten CGH- gestützten Untersuchungen von sporadischen Nebennierenrindentumoren vergleichbar. So fanden Zhao et al. 1999 bei 2/6 nodulären Hyperplasien, 15/23 Adenomen und 12/12 Karzinomen genetische Alterationen, Sidhu et al. 2002 ermittelten bei 11/18 Adenomen im Mittel 1,1 genetische Aberrationen, bei 13/13 Karzinomen fanden sie im Schnitt 7,6 Veränderungen pro Tumor (Zhao et al. 1999, Sidhu et al. 2002).

Dass eindeutige Unterschiede hinsichtlich der Anzahl genetischer Veränderungen zwischen den Dignitäten vorliegen, konnte mit dem Wilcoxon- Mann- Whitney- Test objektiviert werden. Mit einem Wert von $p < 0,001$ wurde ein hoch signifikanter Unterschied zwischen gut- und bösartigen Befunden bezüglich der Anzahl genetischer Alterationen ermittelt.

Betrachtet man die Bereiche der Anzahl alterierter Chromosomen, lässt sich eine Überschneidung zwischen Adenomen und Karzinomen erkennen (0-7 vs.6-12). Dies würde die Aussagekraft eines genetischen Tests hinsichtlich der Unterscheidbarkeit der Dignitäten mithilfe der Anzahl genetischer Aberrationen pro Tumor natürlich mindern. Man muss

allerdings bedenken, dass es sich bei dem Tumor in der Gruppe der Adenome, der 7 veränderte Chromosomen präsentierte, um die Raumforderung handelt, die von den Pathologen nicht sicher klassifiziert werden konnte. Setzt man den Bereich der von Alterationen betroffenen Chromosomen ohne diesen Tumor, würden die Adenome zwischen 0 und 3 Aberrationen zeigen und wären sicher von den Karzinomen mit mindestens 6 veränderten Chromosomen zu trennen.

Sidhu et al. 2002 behaupteten, dass das Vorkommen von 4 oder mehr genetischen Aberrationen in einer CGH- gestützten Genomuntersuchung an Nebennierenrindentumoren stark suggestiv für das Vorliegen eines malignen Tumors ist (Sidhu et al. 2002). Diese Aussage können wir mit unseren Ergebnissen bestätigen, auch wir fanden bei den sicher als benigne klassifizierten 16 Tumoren immer weniger als 4 (0-3) chromosomale Alterationen pro Tumor, alle malignen Befunde dagegen präsentierten immer mehr als 4 (6-12) veränderte Chromosomen (Abbildung 10).

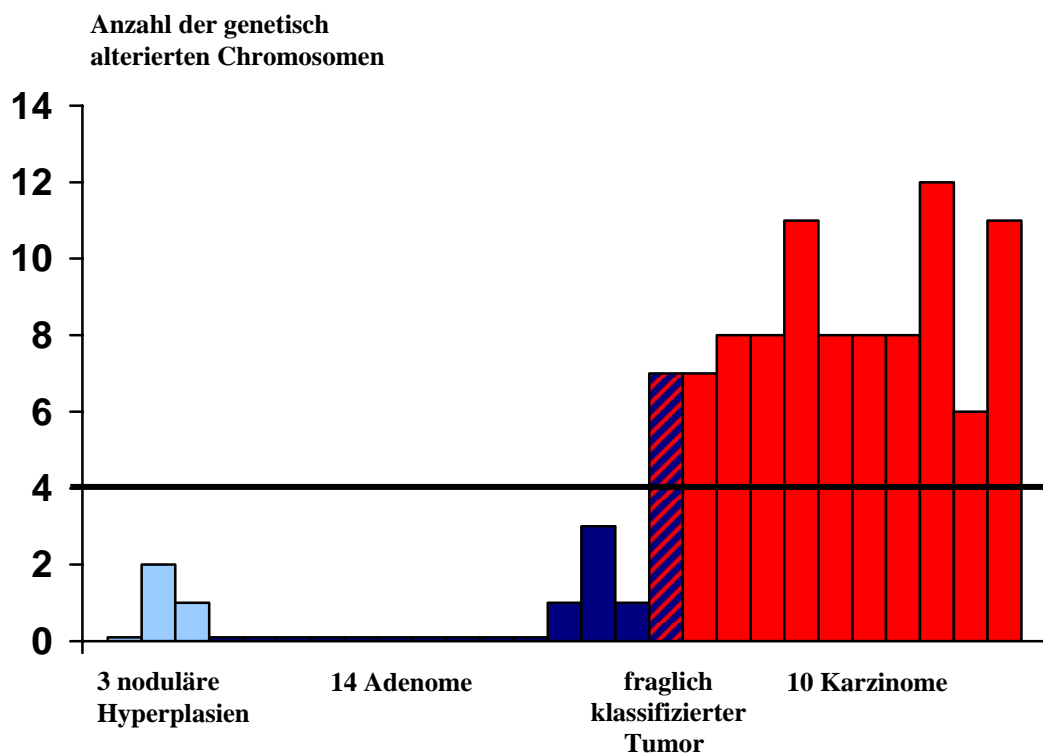


Abbildung 10: Darstellung aller untersuchten Nebennierenrindentumoren mit der jeweiligen Anzahl alterierter Chromosomen; die eingezeichnete schwarze Linie markiert den nach Sidhu et al. 2002 gesetzten Grenzwert von vier genetischen Alterationen pro Tumor.

Bei insgesamt 10 Adenomen zeigte die CGH keine genetischen Veränderungen. Möglicherweise sind die genetischen Alterationen so klein, dass sie mit der CGH, welche ein

Auflösungsvermögen von etwa 10 Megabasen hat (Joos et al. 1993, Bentz et al. 1998), nicht detektierbar sind. Eine zweite Möglichkeit der Erklärung unauffälliger Befunde könnte in der Klonalität der Tumoren liegen. Diese wurde für die Raumforderungen der Nebennieren recht gut erforscht (Beuschlein et al. 1994, Gicquel et al. 1994). Während Karzinome in der Regel monoklonal sind, können Adenome sowohl mono- als auch polyklonal sein. Mit der CGH ist die Wahrscheinlichkeit, genetische Alterationen zu entdecken, in einer monoklonalen Zellpopulation höher. In polyklonalen Zellpopulationen können einzelne chromosomale Veränderungen nur bei einem geringen Zellanteil vorliegen und somit dem Nachweis mittels CGH entgehen. Um entsprechende Alterationen detektieren zu können, müssen diese in mindestens 60% der Zellen vorliegen.

6.2. Korrelation zwischen Anzahl genetischer Veränderungen und Größe des Tumors

Eine Korrelation zwischen der Anzahl der veränderten Chromosomen zur Größe des jeweiligen Tumors lässt sich nur eingeschränkt erkennen. Zwar präsentierten die kleineren Tumoren sowohl bei den benignen als auch bei den malignen Befunden in den meisten Fällen weniger Aberrationen als die großen, man kann aber nicht erkennen, dass eine Größenzunahme auch immer mit einer Zunahme der Anzahl genetischer Alterationen einhergeht. Errechnet man den Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen der Anzahl der genetischen Veränderungen und der Größe des Tumors und schließt alle untersuchten Nebennierenrindentumoren ein, erhält man einen Wert von 0,797. Dies würde einer hohen Abhängigkeit zwischen beiden Variablen entsprechen. Hierbei besteht allerdings ein Interpretationsfehler, denn bei den von uns untersuchten großen Tumoren handelt es sich in der Regel um Karzinome, die entsprechend ihrer Dignität und nicht abhängig von ihrer Größe Alterationen präsentierten. Unterteilt man die Tumoren in gut- und bösartige und errechnet die Korrelationskoeffizienten, erhält man für die sicher klassifizierten gutartigen Befunde einen Wert von 0,639. Dies entspräche einer gewissen Abhängigkeit zwischen beiden Variablen. Ein Korrelationskoeffizient von 0,262 bei den Karzinomen bedeutet allerdings, dass nur ein schwacher Zusammenhang zwischen der Anzahl genetischer Veränderungen und der Größe des Tumors besteht.

Die Operationsindikation für Nebennierentumoren wird, neben einer funktionellen Aktivität und tumorspezifischen radiologischen Kriterien, insbesondere anhand der Größe der Raumforderung gestellt. Sie liegt laut derzeit gültigen Empfehlungen definitiv bei 6cm Tumorgöße, bei 4 – 6 cm Größe muss individuell entschieden werden. Wie oben bereits erwähnt, ist die Tatsache, dass man die Therapieentscheidung häufig von der Tumorgöße und

der damit verbundenen Wahrscheinlichkeit eines malignen Potentials abhängig macht, keine optimale Lösung, zumal bekannt ist, dass bis zu 10% der Nebennierenkarzinome zum Diagnosezeitpunkt kleiner als 4 – 6 cm sind (Dackiw et al. 2001). Betrachtet man alle von uns untersuchten Tumoren im Größenbereich zwischen 4 und 6 cm kann man keine Korrelation der Anzahl genetischer Veränderungen zur Größe erkennen. Eine eindeutige Abhängigkeit konnte allerdings für die Anzahl der Veränderungen zur Dignität festgestellt werden. Es war möglich, die Tumoren entsprechend der Anzahl genetischer Veränderungen ihrer Dignität zuzuordnen. So präsentierten die beiden Karzinome mit den Tumorgrößen 4,2cm und 5,0cm jeweils 8 Chromosomen, die von Veränderungen betroffen sind, die größte noduläre Hyperplasie (4,8cm) und ein Adenom (3,9cm) dagegen nur ein betroffenes Chromosom. Auch bei den beiden größten sicher klassifizierten Adenomen (6,3 und 6,8 cm) konnten nur ein respektive drei veränderte Chromosomen gefunden werden (Abbildung 11).

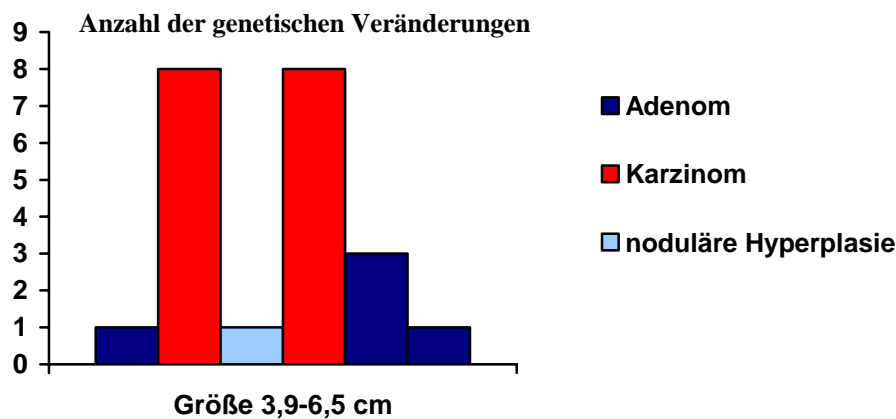


Abbildung 11: Anzahl der genetischen Veränderungen für alle Tumoren zwischen 3,9 und 6,5 cm Größe (maximaler Durchmesser), links mit dem kleinsten Tumor beginnend.

Diese Ergebnisse implizieren, dass mithilfe einer genetischen Untersuchung das biologische Verhalten von adrenokortikalen Tumoren unabhängig von der Größe durch die Anzahl der genetischen Veränderungen vorhergesagt werden kann.

Insgesamt kann man einschätzen, dass die Anzahl veränderter Chromosomen deutlich von der Dignität und kaum von der Größe des Tumors abhängig ist. Zum einen stärkt dies die Aussage, dass ein genetischer Test zwischen gut- und bösartigen Befunden unterscheiden kann. Zum anderen bedeutet es, dass Nebennierentumoren mit einem genetischen Test gut zu differenzieren sind, weil sie bei Größenzunahme nicht unbedingt auch vermehrt Aberrationen zeigen, sondern dann vermehrt genetische Veränderungen präsentieren, wenn ein maligner Tumor vorliegt.

6.3. Spezifische chromosomale Veränderungen der Nebennierentumoren

In unserer Untersuchung von sporadischen Nebennierentumoren konnten einige chromosomale Regionen identifiziert werden, welche in der Entwicklung dieser Tumoren mit hoher Wahrscheinlichkeit eine entscheidende Rolle spielen.

Der Verlust genetischen Materials auf Chromosomarm 1p war in 50% der Karzinome sowie bei dem nicht sicher klassifizierbaren Tumor nachzuweisen. Damit konnten Ergebnisse anderer Autoren bezüglich dieser Region bestätigt werden. Zhao et al. 1999 fanden diesen Defekt bei 67% ihrer untersuchten Karzinome, Sidhu et al. 2002 entdeckten ihn bei 62% der Karzinome (Zhao et al. 1999, Sidhu et al. 2002). Dies suggeriert, dass Tumorsuppressorgene, welche auf 1p liegen, in der Tumorgenese der Nebennierentumoren eine wichtige Rolle spielen. Ein Kandidat ist das p73, welches im distalen kurzen Arm von Chromosom 1 liegt. Sowohl für das Mammakarzinom (Tsukamoto et al. 1998) als auch für Keimzelltumoren (Mathew et al. 1994) ist ein LOH für die Region 1p bekannt, möglicherweise gibt es Gemeinsamkeiten bezüglich auslösender Tumorsuppressorgenfunktionsverluste.

Besonders häufig ist in unserer Untersuchung auch Chromosomarm 3p von Verlusten betroffen (70% der Karzinome). In der Arbeit von Zhao et al. 1999 konnte dieser Verlust bei 50% der Karzinome nachgewiesen werden. Bekannt ist der Verlust genetischen Materials auf 3p insbesondere für das sporadische Nierenzellkarzinom, ein hoher Prozentsatz dieser Tumoren geht mit einem LOH für das Von- Hippel- Lindau- Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 3 einher (Phillips et al. 2001). Ob der Funktionsverlust des VHL- Tumorsuppressorgens eine Rolle in der Genese der sporadischen Nebennierenrindenraumforderungen spielt, ist fraglich, möglicherweise sind andere Tumorsuppressorgene mit Sitz auf 3p an der Progression dieser Tumoren beteiligt.

In 60% aller malignen Nebennierenrindentumoren fanden wir einen Verlust genetischen Materials auf Chromosomarm 6q. Zhao et al. 1999 konnten bei 42% ihrer Karzinome einen Verlust in der chromosomalen Region 6q entdecken.

Bei 30% der Karzinome ermittelten wir einen Verlust auf 11/11p. Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 liegen die Gene für den Insulin- like- growth- factor (IGF) und H19 sowie das Gen für den Zellregulator p57/KIP2. Für das IGF-2 Gen konnte eine uniparenterale paternale Disomie, welche mit einer Überexpression von IGF 2 einhergeht, beim

sporadischen Nebennierenkarzinom gezeigt werden (Gicquel et al. 1997). Die CGH ist allerdings nicht in der Lage, solche Phänomene des Imprintings zu detektieren. Das Gen für p57/KIP2 kodiert für den Tumorsuppressor p57, dieser wirkt negativ regulierend auf die Zellproliferation durch Hemmung des Cyclin- dependent- kinase- (CDK-) Komplexes. Möglicherweise ist eine Mutation in diesem Gen für die Entwicklung sporadischer Nebennierentumoren mitverantwortlich.

Neben dem Verlust von Chromosomarm 11p fand sich in 30% der Karzinome auch ein Verlust von 11q, ein Ergebnis, welches in nahezu allen durchgeführten CGH- gestützten Arbeiten an Nebennierenrindentumoren (Kjellman et al. 1996, Zhao et al. 1999, Sidhu et al. 2002) ähnlich zu finden ist. Für die hereditäre Tumorerkrankung MEN- 1 ist ein Verlust der Tumorsuppressorfunktion des MEN-1-Gens, welches auf Chromosomarm 11q (11q13) lokalisiert ist, beschrieben. Es wurde allerdings durch andere Untersuchungsmethoden nachgewiesen, dass sich Mutationen im MEN-1-Gen bei sporadischen Nebennierentumoren nur sehr selten finden (Schulte et al. 1999, Schulte et al. 2000), was suggeriert, dass andere Tumorsuppressorgene dieses Chromosomenarmes eine Rolle in der Tumorgenese der sporadischen Nebennierentumoren spielen.

Der in der Genese anderer Tumorerkrankungen häufig betroffene Chromosomenarm 17p, Sitz des Tumorsuppressorgens p53, war in 20% aller untersuchten Karzinome von Verlusten genetischen Materials betroffen. Damit können Ergebnisse anderer genetischer Untersuchungsmethoden bestätigt werden, welche in 20% respektive 27% aller untersuchten Nebennierenrindenkarzinome eine Alteration dieser Region fanden (Ohgaki et al. 1993, Reincke et al. 1994). Man kann annehmen, dass dieser gut untersuchte Mechanismus der Tumorentstehung auch bei den Nebennierenkarzinomen, zumindest für einen Teil von ihnen, eine Rolle spielt.

In unserer Untersuchung war es möglich, bisher in dieser Häufigkeit nicht gekannte genetische Alterationen zu ermitteln. So fanden wir in 70% der Karzinome einen Verlust auf Chromosomarm 18q, auch über Verluste in den chromosomalen Regionen 1q, 6p, 7q, 9q, 10q, 13q, 14q und 15q, die in 30 – 40 % der Karzinome auftraten, wurde bisher in dieser Häufigkeit bei Nebennierenrindentumoren nicht berichtet.

Der Verlust auf Chromosomarm 18q ist eine in der Tumorgenese anderer Tumoren sehr gut untersuchte genetische Alteration, sie ist insbesondere für das prognostisch schlechte duktales Pankreaskarzinom (Furukawa et al. 2006), das Mammakarzinom (Morikawa et al. 2005), kolorektale Karzinome (Jiang et al. 2005) und das Nierenzellkarzinom (Hirata et al. 2005) dargestellt worden. Für die chromosomale Region 18q konnten einige Tumorsuppressorgene ermittelt werden, deren Funktionsverlust mit einer Tumorprogression einhergehen könnte. Bekannt ist insbesondere das SMAD4, ein Signalmediator, welcher eine wichtige Rolle in einer negativen Regulation der Zellproliferation, der Angiogenese und der Immunsuppression hat. Außerdem werden weitere Tumorsuppressorgene in dieser Region vermutet, die, wahrscheinlich in Kombination, die Progression verschiedener Tumoren vorantreiben können.

Einen Verlust genetischen Materials auf Chromosomarm 13q konnten wir in 40% aller Karzinome nachweisen. Bekannt ist diese Alteration z.B. für das Prostatakarzinom, wo man davon ausgeht, dass der Verlust bisher nicht entdeckter Tumorsuppressorgene auf diesem Chromosomenarm zur Tumorinitiation und Tumorprogression bis hin zum metastasierenden Prostatakarzinom führen kann (Lu et al. 2006).

Zugewinne genetischen Materials fanden wir insgesamt weniger häufig als Verluste. In 30% der von uns untersuchten Nebennierenkarzinome ermittelten wir einen Zugewinn auf Chromosom/-arm 7/7q. Man muss den Verdacht haben, dass sich hier Protoonkogene befinden, welche, zumindest bei einem Teil der Karzinome, in die Tumorgenese eingreifen.

Mit unseren Ergebnissen konnten wir bestätigen, dass Onkogene auf den Chromosomen 4 und 5 einen Einfluss auf die Tumorgenese der Nebennierenrindentumoren haben. Wie die Arbeiten von Kjellman et al., Zhao et al., Dohna et al. und Sidhu et al. fanden auch wir Zugewinne auf diesen Chromosomen in der Gruppe der Karzinome (Kjellman et al. 1996, Zhao et al. 1999, Dohna et al. 2000, Sidhu et al. 2002). Auf Chromosom 5p liegt das Protoonkogen SKP2 (Zhang et al. 1995), bei ihm wird eine Beteiligung an der Tumorprogression der Nebennierentumoren vermutet (Sidhu et al. 2002). Allerdings fanden wir im Gegensatz dazu bei anderen von uns untersuchten Karzinomen entgegengesetzte Ergebnisse, so waren die Chromosomenarme 4q und 5q bei drei Karzinomen von Verlusten genetischen Materials betroffen.

6.4. Vergleich der spezifischen chromosomalen Aberrationen zwischen gut- und bösartigen Befunden

Spezifische chromosomale Aberrationen traten in der Gruppe der gutartig klassifizierten Tumoren nur vereinzelt auf. Allerdings muss man erwähnen, dass etwa 86% der entdeckten Alterationen auch bei den Karzinomen zu finden waren.

Dies würde die These einer Adenom – Karzinom – Sequenz, so wie sie für andere Tumorerkrankungen des Menschen beschrieben ist, unterstützen. Genetische Veränderungen, welche bei kleinen oder gutartigen Tumoren entdeckt werden und auch bei bösartigen Befunden nachweisbar sind, könnten Hinweis für einen gemeinsamen Ursprung der Entwicklung dieser Raumforderungen aus gesundem Gewebe sein. Eine Subpopulation von Zellen gewinnt durch verschiedenste genetische Ereignisse einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zelllinien, es kommt zur Formation einer Raumforderung. Später einsetzende Schädigungen des genetischen Materials führen dann zu einer Transformation in bösartiges Tumorgewebe.

Ein Beispiel aus unserer Untersuchung sporadischer Nebennierentumoren wäre der Zugewinn auf 9p, der sowohl bei einer nodulären Hyperplasie, bei einem Adenom und bei 20% der Karzinome nachzuweisen war. Vorstellbar ist, dass sich in dieser Region ein Protoonkogen befindet, welches in einem frühen Stadium der Tumorentwicklung eine Aktivierung zum Onkogen erfährt und damit bei einem Teil der Tumoren für die Formation zu einer Raumforderung verantwortlich ist.

Hinweise auf die Möglichkeit einer solchen Tumorprogression findet man auch bei den Verlusten genetischen Materials. Alle ermittelten Verluste der benigne klassifizierten Befunde fanden sich bei einem hohen Prozentsatz der Karzinome. Man kann spekulieren, dass sich in diesen chromosomalen Regionen Tumorsuppressorgene befinden, die durch einwirkende Schädigungen am Genom einen Funktionsverlust erleiden und somit die Entwicklung gesunden Nebennierenrindengewebes in unreguliert wachsendes Tumorgewebe ermöglicht wird.

Die Tumorinitiation auslösende genetische Ereignisse konnten für die sporadischen Nebennierentumoren bisher nicht definiert werden (Koch et al. 2002). Erste Entwürfe von Tumorprogressionsmodellen wurden von verschiedenen Autoren gemacht. Kjellman et al. leiteten von jeweils zwei genetischen Untersuchungen an Erwachsenen und Kindern ab, dass

frühe genetische Ereignisse, welche die Formation von Adenomen aus gesundem Nebennierengewebe erlauben, eine Amplifikation genetischen Materials auf den Chromosomen/-armen 9q und 17 sind. Später treten dann Ereignisse wie die Überexpression von IGF-2 auf 11p, wie Punktmutationen auf 17p im Gen für p53 oder wie der Verlust genetischen Materials der chromosomalen Regionen 1p, 2p oder 11q auf, welche zu einer Transformation in malignes Gewebe führen (Kjellman et al. 2001). Dieses Modell wurde allerdings von anderen Autoren abgelehnt. Zum einen denkt man, dass die Ergebnisse von genetischen Untersuchungen an kindlichen Tumoren mit denen von Erwachsenen nicht vergleichbar sind. Zum zweiten hat man in späteren Untersuchungen sporadischer Nebennierentumoren die Ergebnisse der genutzten Untersuchungsserien nicht oder nur teilweise bestätigen können.

Ein weiteres Tumorprogressionsmodell wurde von Sidhu et al. 2002 erstellt. Hier tritt als mögliches frühes Ereignis eine Aktivierung von Protoonkogenen auf Chromosom 4 auf, gefolgt von Funktionsgewinnen von Protoonkogenen auf den Chromosomen 5 und 12 und Verlusten der Tumorsuppressorfunktionen auf den Chromosomenarmen 1p und 17p, welche zur Progression vom Adenom zum Karzinom führen (Sidhu et al. 2002).

Das in unserer Arbeit dargestellte Vorkommen einer hohen Anzahl genetischer Veränderungen, insbesondere das extensive Vorkommen von Verlusten genetischen Materials bei den Karzinomen, lässt vermuten, dass die molekulargenetische Pathogenese der Nebennierenkarzinome sehr komplex ist, und dass Tumorprogression und maligne Transformation mit einer Akkumulation multipler genetischer Aberrationen einhergeht.

Entsprechend unseren Ergebnissen kann man folgendes Progressionsmodell für die sporadischen Nebennierenrindentumoren entwerfen. Die Alteration Zugewinn 9p war sowohl bei den nodulären Hyperplasien, bei Adenomen als auch bei Karzinomen nachzuweisen. Der Verlust genetischen Materials auf den Chromosomen/-armen 3/3p, 5/5q, 11/11p und 14q war bei Adenomen und, in teilweise hohen Prozentzahlen, bei den Karzinomen zu zeigen. Diese Alterationen könnten dementsprechend schon in einem frühen Stadium der Tumorprogression aufgetreten sein. Insgesamt 9 der 10 untersuchten Karzinome präsentierten die eben genannten Veränderungen. Alterationen wie der Verlust genetischen Materials in den chromosomalen Regionen 1p, 1q, 6p, 6q, 9q, 10q, 13q, 15q und 18q sowie der Zugewinn auf 5/5p waren dagegen ausschließlich in der Gruppe der Karzinome zu finden und müssen als Faktoren der malignen Transformation gewertet werden (Abbildung 12).

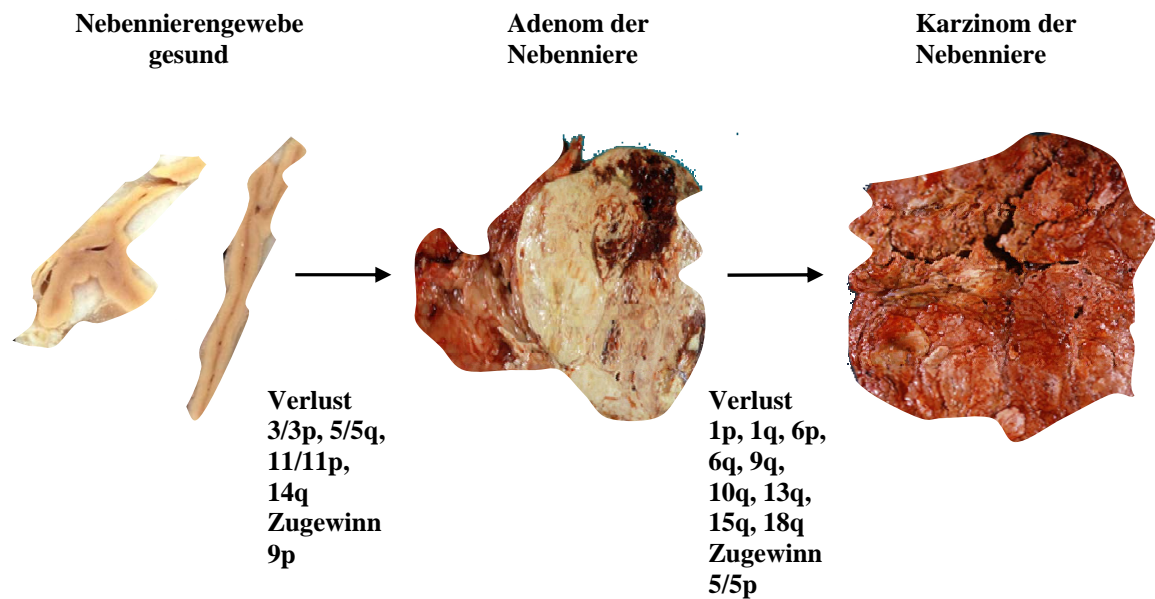


Abbildung 12: Darstellung eines Tumorprogressionsmodells für Nebennierenrindentumoren, abgeleitet aus den Ergebnissen der von uns untersuchten Nebennierenrindentumoren.

6.5. Genetische Heterogenität der Nebennierentumoren

Wie bereits oben beschrieben wird die Entwicklung von Tumoren als ein Prozess angesehen, welcher aus mehreren Schritten besteht. Eine Tumorentstehung- initiiierende Mutation stattet eine Zelle mit einem Wachstumsvorteil aus, die Tumorentwicklung aus gesundem Gewebe beginnt. Durch weiteren Einfluss mutagener Faktoren entstehen parallel nebeneinander Zellpopulationen mit unterschiedlichen genetischen Alterationen. Die einzelnen Zelllinien treten in Konkurrenz zueinander. Selektioniert werden die Zellpopulationen mit den größten Wachstumsgeschwindigkeiten, der Tumor steigert sein malignes Potential. Demnach präsentieren Tumoren ein Nebeneinander von Zellpopulationen mit unterschiedlichen genetischen Alterationen, das genetische Bild des Tumors ist heterogen.

Das Adenom mit der Nummer 15 wurde an drei Stellen untersucht, die Areale B und C präsentierten jeweils eine (11p), das Areal A drei chromosomale Regionen (5q, 11p, 14q) mit Alterationen. Der Verlust auf 11p war in allen drei Arealen zu ermitteln. Wie oben bereits erwähnt, muss diese Aberration, welche auch in 30% der Karzinome zu finden war, als ein Hinweis auf eine Adenom – Karzinom – Sequenz verstanden werden.

Keine genetischen Veränderungen fanden sich bei der Raumforderung mit der Nummer 6 in allen 5 untersuchten Arealen. Dies als genetische Homogenität einzuschätzen wäre allerdings nicht korrekt, da die Sensitivität der CGH begrenzt ist.

Homogen war der bösartige Tumor mit der Nummer 25. Von insgesamt 13 ermittelten genetischen Alterationen konnten 10 in beiden untersuchten Arealen gefunden werden.

Bei dem Karzinom mit der Nummer 21 wurden 4 Areale genetisch untersucht, in allen 4 Arealen konnten die für Karzinome so häufig gefundenen Aberrationen wie die Verluste auf 1p, 3, 6/6q und 13q ermittelt werden.

Natürlich kann man anhand von 4 Tumoren keine Aussage machen, ob Nebennierentumoren eine homogene oder heterogene genetische Differenzierung haben. Feststellen kann man nur, dass die von uns untersuchten Tumoren in allen untersuchten Arealen typische Eigenschaften der anderen Adenome bzw. Karzinome präsentierten. So fanden sich bei den beiden Adenomen in allen Ebenen stets eine geringe Anzahl an chromosomalen Aberrationen (0 – 3), die Karzinome dagegen präsentierten in allen Arealen viele Veränderungen (6 – 11). Auch konnten bei den Karzinomen häufig ermittelte Alterationen wie Verlust 1p, 3/3p, 6/6q, 13q oder 18q in vielen Arealen eines Tumors dargestellt werden.

6.6. Diskussion der fraglich klassifizierten Raumforderung

Diskutiert werden muss der Tumor, welcher von den Pathologen nur unsicher als Adenom klassifiziert werden konnte. Entsprechend der Ergebnisse der genetischen Untersuchung dieses Tumors muss man eine maligne Raumforderung vermuten. Zum ersten ist für ein Adenom das Auftreten von 7 veränderten Chromosomen pro Tumor ungewöhnlich. Während die anderen benignen Raumforderungen zwischen 0 – 3 Veränderungen mit einem Durchschnittswert von 1,67 alterierten Chromosomen pro Tumor präsentierten, trat ein Wert von 7 Aberrationen sonst nur bei Karzinomen auf. Außerdem existiert die Behauptung, dass das Vorkommen von mehr als 4 genetischen Alterationen pro Tumor in einer genetischen Untersuchung mittels CGH stark suggestiv für einen malignen Tumor ist (Sidhu et al. 2002). Zum zweiten zeigte der fragliche Tumor, anders als die sicher klassifizierten Adenome und ähnlich wie die Karzinome, weitaus mehr Verluste als Zugewinne genetischen Materials (6:1). Zum dritten waren alle spezifischen chromosomalen Veränderungen dieses Tumors auch typische Alterationen in der Gruppe der Karzinome (Verlust auf 1p (50%), 4q (30%), 7q (30%), 8p (20%), 10q (30%), 13q (40%), Gewinn auf 18p (10% der untersuchten Karzinome). Zum vierten muss man die klinische Situation der Patientin bedenken. Dass bei einer jungen Frau (39 Jahre) mit einer klinischen Symptomatik (Cushing- Syndrom) eine 7cm große Raumforderung entdeckt wird, ist für Adenome ungewöhnlich, für Karzinome dagegen typisch.

Aufgrund der Ergebnisse der genetischen Untersuchung dieses Tumors kann man feststellen, dass der Einsatz einer genetischen Diagnostik zu einer sicheren Klassifikation eines Nebennierentumors führt.

6.7. Diskussion der Ergebnisse der Nebennierenmarktumoren

Aufgrund einer unterschiedlichen genetischen Differenzierung zur Nebennierenrinde muss man die Ergebnisse der von uns untersuchten Nebennierenmarktumoren gesondert betrachten. Leider konnten wir nur 5 Tumoren dieser Lokalisation untersuchen, daher sind allgemeine Aussagen zur Genetik der Nebennierenmarktumoren nur eingeschränkt möglich. Allerdings lassen die erzielten Ergebnisse doch recht interessante Interpretationen zur Entwicklung der von uns untersuchten Tumoren zu. Des Weiteren kann man diese Ergebnisse mit bereits bekanntem Wissen über die Genetik der Nebennierenmarktumoren vergleichen.

Wir fanden deutliche Unterschiede in der Art und Anzahl der genetischen Veränderungen zwischen beiden Geschlechtern. So präsentierten die beiden Tumoren der männlichen Patienten weitaus mehr Chromosomen mit Verlusten genetischen Materials als mit Zugewinnen (4 Verluste zu 1 bzw. 0 Zugewinnen). Die Raumforderungen der weiblichen Patienten dagegen zeigten mit Verhältnissen von 6:0, 9:0 und 11:3 erheblich mehr Zugewinne als Verluste. In einer Untersuchung an 29 sporadischen Phäochromozytomen fanden Dannenberg et al. interessanterweise und in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen heraus, dass die Tumoren der männlichen Patienten nur in wenigen Ausnahmefällen Zugewinne genetischen Materials präsentieren (Dannenberg et al. 2000).

Beeindruckend ist, dass zwei Tumoren der weiblichen Patienten als auch zwei Tumoren der männlichen Patienten jeweils nahezu identische Ergebnisse lieferten. So präsentierte der Tumor einer Frau (Nummer 28) Zugewinne auf den Chromosomen/-armen 5q, 8q, 12, 16, 20 und X, bis auf den Gewinn auf Chromosom 8 fanden sich die gleichen Aberrationen auch bei dem Tumor der zweiten Patientin (Nummer 30). Die Raumforderung der zweiten Patientin zeigte gesondert dazu noch Zugewinne auf den Chromosomen/-armen 4, 5p, 7, 10 und 21. Man kann anhand des nahezu identischen genetischen Musters postulieren, dass die beiden Tumoren der Patientinnen eine ähnliche Entwicklung durchlaufen haben müssen. Der Tumor der zweiten Patientin, welcher mehr genetische Veränderungen präsentierte, scheint dabei in seinem Wachstumspotential der noch gefährlichere zu sein. Diese Aussage wird durch weitere Daten der Patientinnen untermauert. Die Patientin mit dem Tumor, der 6 chromosomale

Alterationen präsentierte, war zum Operationszeitpunkt 52 Jahre alt, der Tumor hatte eine Größe von 32 Millimetern. Die Patientin mit der Raumforderung, an welcher 9 veränderte Chromosomen zu finden waren, war zum Operationszeitpunkt erst 39 Jahre alt und der Tumor hatte bereits eine Größe von 55 Millimetern.

Die beiden Tumoren der männlichen Patienten (Nummer 29 und 31) präsentierten ebenfalls in etwa gleiche Ergebnisse. Beide Raumforderungen der Männer zeigten Verluste auf 1p, 3q und 17p, gesondert präsentierten sie jeweils einen Verlust auf 6q respektive 8p. Auch hier muss man von einer ähnlichen Tumorprogression ausgehen.

Der fünfte untersuchte Tumor des Nebennierenmarkes (Nummer 32) präsentierte mit 12 veränderten Chromosomen die meisten genetischen Alterationen. Gemeinsam mit den anderen von uns untersuchten Tumoren des Nebennierenmarkes sind die Zugewinne auf den Chromosomen 7, 12, 20 und X sowie der Verlust auf Chromosomarm 6q.

Eine CGH- gestützte Untersuchung wurde durch Dannenberg et al. an 29 sporadischen Phäochromozytomen durchgeführt. Alle untersuchten Tumoren präsentierten genetische Veränderungen, dabei zeigten die benignen Befunde weniger Alterationen als die malignen Raumforderungen (im Mittel 5,3 vs. 8,2 Chromosomenarmalterationen pro Tumor). Es ließ sich keine Korrelation zwischen der Anzahl der genetischen Veränderungen und der Größe des Tumors bei beiden Tumordignitäten feststellen (Dannenberg et al. 2000). Eine weitere genetische Untersuchung der Nebennierenmarktumoren mittels CGH führten August et al. durch, auch sie konnten keine Korrelation zwischen Größe und Anzahl der genetischen Alterationen feststellen, die Tumorgröße als prädiktiver Faktor wird daher von diesen Autoren nicht akzeptiert (August et al. 2004). Die von uns untersuchten Tumoren zeigten nur eine mäßige Korrelation zwischen der Anzahl der genetischen Veränderungen und der Größe des Tumors. Zwar präsentierte der größte Tumor auch die meisten Veränderungen, bei den anderen vier Tumoren ließ die Größe allerdings keine Vorhersagen zur Anzahl der Alterationen zu. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson beträgt für alle fünf Tumoren 0,601. Nimmt man den größten Tumor aus dieser Berechnung heraus, zeigt sich eine negative Korrelation zwischen der Anzahl genetischer Veränderungen und der Größe des Tumors (Koeffizient = -0,163). Dies verdeutlicht, dass man anhand der wenigen von uns untersuchten Tumoren keine allgemein gültigen Aussagen zum Zusammenhang zwischen diesen beiden Variablen machen kann.

Die häufigste spezifische chromosomale Aberration, die von allen CGH- gestützten Untersuchungen gefunden wurde, ist ein Verlust auf Chromosomarm 1p. Er trat bei Dannenberg et al. in 86%, bei Erdstrom et al. in 83% und bei August et al. in 76% aller Phäochromozytome, unabhängig von der Dignität, auf (Dannenberg et al. 2000, Edstrom et al. 2000, August et al. 2004). Auch wir konnten diese Alteration nachweisen. Als potentiell an der Tumorgenese der Nebennierenmarktumoren beteiligte Tumorsuppressorgene, welche auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 lokalisiert sind, gelten das CDKN2C, das PTPRF, das p18INK4C sowie viele andere mehr, welche mit sensibleren genetischen Untersuchungen identifiziert werden konnten (Aarts et al. 2006). Ein Verlust auf 1p ist auch typisch für Neuroblastome, man vermutet daher einen gemeinsamen genetischen Ursprung dieser beiden neuroendokrinen Tumoren (Ejeskar et al. 2001).

Ein zweites häufiges Ereignis ist der Verlust auf 3q, der auch bei den von uns untersuchten Tumoren auftrat. Da diese Alteration insbesondere auch bei benignen Befunden zu finden ist, schreibt man ihr, wie auch dem Verlust von 1p, eine Beteiligung in einem frühen Stadium der Tumorprogression zu (Dannenberg et al. 2000).

Der dargestellte Verlust auf Chromosomarm 17p, wie er bei zwei unserer Tumoren zu finden war, gilt als weitere typische Alteration der sporadischen Nebennierenmarktumoren. Vermutet werden eine Beteiligung des bei vielen Tumorgenesen bekannten Tumorsuppressorgens p53 oder auch des Medulloblastomgens auf Chromosom 17 (17p13.3).

Dannenberg et al. fanden einen Verlust auf Chromosomarm 6q nahezu ausschließlich in der Gruppe der malignen Befunde und interpretierten daher, dass das Auftreten dieser Alteration mit einer Transformation in ein malignes Phäochromozytom einhergeht. Bekannt ist der Verlust auf 6q auch bei anderen malignen Erkrankungen (Gaidano et al. 1992, Bell et al. 1997, Healy et al. 1998, Speel et al. 1999), wenngleich bisher noch kein Tumorsuppressorgen für diese Region identifiziert werden konnte. Zwei der von uns untersuchten Tumoren präsentierten Verluste auf 6q, einer der beiden Tumoren eines männlichen Patienten (29) und der Tumor (32), bei dem wir die meisten genetischen Veränderungen fanden. Auch die Arbeit von August et al. ermittelte einen Genlocus, dessen Alteration mit einem hohen malignen Potential des Tumors einhergeht, es handelt sich um einen Zugewinn genetischen Materials in der chromosomalen Region 17q. Der Größte der von uns untersuchten Nebennierenmarktumoren (32) zeigte auch diese Aberration. Des Weiteren postulierten August et al. anhand ihrer Ergebnisse, dass das Auftreten von 10 und mehr genetischen Alterationen in einer CGH- gestützten Untersuchung von sporadischen

Nebennierenmarktumoren mit einem hohen malignen Potential des betroffenen Tumors einhergeht. Bei den von uns untersuchten Tumoren trifft dies für den größten Tumor (32) zu.

Zusammenfassend kann man zu den Nebennierenmarktumoren einschätzen, dass die von uns untersuchten Raumforderungen Ergebnisse lieferten, welche mit dem bisher bekannten Wissen über die Genetik dieser Tumoren gut übereinstimmen. So konnten typische genetische Alterationen wie Verluste auf den Chromosomenarmen 1p, 3q und 17p dargestellt werden. Auch die geringe Korrelation der Anzahl genetischer Veränderungen zur Größe und die ungewöhnliche Korrelation der Anzahl genetischer Alterationen zum Geschlecht sind in größeren Untersuchungsserien dargestellt worden. Projiziert man die in großen Untersuchungsserien ermittelten Ergebnisse hinsichtlich der Dignitätsbeurteilung auf die von uns untersuchten Tumoren muss man vermuten, dass zumindest die größte der fünf Raumforderungen (32) ein hohes malignes Potential besitzt (junge Patientin (44 Jahre), über 10 alterierte Chromosomen, Auftreten der spezifischen Aberrationen Verlust 6q und Zugewinn 17q).

7. Schlussfolgerungen

Die durchgeführte Untersuchung von sporadischen Nebennierenrindentumoren konnte ein hohes Maß an genetischen Veränderungen ermitteln, dabei zeigten sich eindeutige Unterschiede zwischen gut- und bösartigen Befunden. Während die nodulären Hyperplasien und Adenome nur wenige bis keine Alterationen des genetischen Materials zeigten, traten diese bei den Karzinomen in hohem Maße auf. Eine Unterscheidung zwischen den Dignitäten ist entsprechend der Anzahl genetischer Veränderungen bei den von uns untersuchten Tumoren zweifelsfrei möglich, als Grenzwert sollte das Vorhandensein von vier genetischen Alterationen angesehen werden.

Eine so eindeutige Abhängigkeit wie zwischen der Anzahl genetischer Veränderungen und der Dignität konnte zwischen der Anzahl der Alterationen und der Größe des Tumors nicht gezeigt werden. Man kann die Aussagen einzelner Autoren nur unterstützen, dass die Tumorgroße als diagnostischer Marker nur unzureichend geeignet ist, auch kleine Befunde müssen intensiv untersucht werden. Sollte sich in Zukunft die Tumorbiopsie in der Diagnostik der Nebennierenraumforderungen etablieren, wäre ein Einsatz genetischer Tests in der Untersuchung des Präparates zu empfehlen.

Bei den gutartigen Befunden konnten nur wenige chromosomale Aberrationen gezeigt werden, allerdings fanden sich 86% dieser Alterationen auch in der Gruppe der Karzinome. Man kann daher die These einer Adenom – Karzinom – Sequenz für die Nebennierentumoren unterstützen.

Entsprechend unseren Ergebnissen konnte ein Tumorprogressionsmodell entwickelt werden. Die spezifischen chromosomalen Alterationen Verlust 3/3p, 5/5q, 11/11p, 14q und Zugewinn 9p, welche bei gut- und bösartigen Tumoren ermittelt wurden, scheinen zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorgenese eingetreten zu sein. Bei den Karzinomen ließ sich eine hohe Anzahl genetischer Veränderungen herausfinden, die molekulargenetischen Pathogenese scheint sehr komplex zu sein. Die Verluste genetischen Materials auf 1p, 1q, 6p, 6q, 10q, 13q, 15q, 18q und der Zugewinn 5/5p traten ausschließlich und in hohem Maße in der Gruppe der Karzinome auf und müssen als Faktoren einer malignen Transformation gewertet werden.

Über die an der Progression der Nebennierenraumforderungen beteiligten Onkogene und Tumorsuppressorgene können derzeit nur begrenzt Hypothesen formuliert werden. Da die

eingesetzte Untersuchungsmethode CGH aufgrund ihres Auflösungsvermögens ein Screening- Verfahren darstellt, können keine Aussagen über einzelne Gene gemacht werden. Daher kann die in dieser Arbeit erfolgte Identifizierung der betroffenen chromosomalen Regionen als Vorarbeit für weitere, sensiblere Untersuchungstechniken verstanden werden.

Da nur 4 Tumoren in mehreren Arealen untersucht wurden, kann keine sichere Aussage zur genetischen Heterogenität der Nebennierentumoren gemacht werden. Feststellen darf man allerdings, dass in allen untersuchten Arealen die für die jeweilige Dignität typische genetische Differenzierung dargestellt werden konnte.

Bei einer Raumforderung, welche von den Pathologen nicht sicher eingeschätzt werden konnte, muss nach der genetischen Untersuchung der Verdacht auf Malignität gestellt werden.

Die ermittelten Ergebnisse der Nebennierenmarktumoren stimmen mit dem bisher bekannten Wissen über die Genetik dieser Raumforderungen gut überein, die typischen Alterationen wie Verlust 1p, 3q und 17p konnten gezeigt werden. Auch die geringe Korrelation der Anzahl genetischer Veränderungen zur Größe und die ungewöhnliche Korrelation der Anzahl genetischer Alterationen zum Geschlecht sind in größeren Untersuchungsserien dargestellt worden.

Neben der Ermittlung von bisher nicht bekannten chromosomalen Aberrationen konnten Ergebnisse anderer Forschungsgruppen in hohem Maße bestätigt werden. Damit wurde ein Beitrag zur dringend erforderlichen genetischen Charakterisierung der bisher spärlich evaluierten Nebennierentumoren geleistet. Man kann davon ausgehen, dass sich durch Erkenntnisse aus weiteren Arbeiten und durch Zusammenschau der bisher ermittelten Ergebnisse diagnostisch nutzbare molekulargenetische Marker ableiten lassen.

Entsprechend unseren Ergebnissen lassen sich zwei Grundaussagen machen. Zum einen ist es gelungen, eine verbesserte Charakterisierung der Nebennierentumoren hinsichtlich ihrer genetischen Differenzierung zu erreichen. Des Weiteren darf man feststellen, dass ein genetischer Test in der Lage ist, zu einer sicheren Klassifizierung von Nebennierentumoren beizutragen. Der Einsatz genetischer Tests in der Routinediagnostik, etwa bei der Befundung von Operationspräparaten, ist daher zu empfehlen.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Aarts M, Dannenberg H, deLeeuw R J, van Nederveen F H, Verhofstad A A, Lenders J W, Dinjens W N, Speel E J, Lam W L, de Krijger R R. 2006. Microarray-based CGH of sporadic and syndrome-related pheochromocytomas using a 0.1-0.2 Mb bacterial artificial chromosome array spanning chromosome arm 1p. *Genes Chromosomes Cancer*, 45(1): 83-93.
2. Aguiar R C, Dahia P L, Sill H, Toledo S P, Goldman J M, Cross N C. 1996. Deletion analysis of the p16 tumour suppressor gene in phaeochromocytomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 45(1): 93-6.
3. Alexander H R, Jr., Chen C C, Shawker T, Choyke P, Chan T J, Chang R, Marx S J. 2002. Role of preoperative localization and intraoperative localization maneuvers including intraoperative PTH assay determination for patients with persistent or recurrent hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res*, 17 Suppl 2: N133-40.
4. Ambrosi B, Peverelli S, Passini E, Re T, Ferrario R, Colombo P, Sartorio A, Faglia G. 1995. Abnormalities of endocrine function in patients with clinically "silent" adrenal masses. *Eur J Endocrinol*, 132(4): 422-8.
5. Angeli A, Osella G, Ali A, Terzolo M. 1997. Adrenal incidentaloma: an overview of clinical and epidemiological data from the National Italian Study Group. *Horm Res*, 47(4-6): 279-83.
6. Arola J, Salmenkivi K, Liu J, Kahri A I, Heikkila P. 2000. p53 and Ki67 in adrenocortical tumors. *Endocr Res*, 26(4): 861-5.
7. August C, August K, Schroeder S, Bahn H, Hinze R, Baba H A, Kersting C, Buerger H. 2004. CGH and CD 44/MIB-1 immunohistochemistry are helpful to distinguish metastasized from nonmetastasized sporadic pheochromocytomas. *Mod Pathol*, 17(9): 1119-28.
8. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Gregianin M, Macri C, Boscaro M. 1998. Incidentally discovered adrenal tumors: endocrine and scintigraphic correlates. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(1): 55-62.
9. Beckers A, Abs R, Willems P J, van der Auwera B, Kovacs K, Reznik M, Stevenaert A. 1992. Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus. *J Clin Endocrinol Metab*, 75(2): 564-70.

10. Bell D W, Jhanwar S C, Testa J R. 1997. Multiple regions of allelic loss from chromosome arm 6q in malignant mesothelioma. *Cancer Res*, 57(18): 4057-62.
11. Belldegrün A, Hussain S, Seltzer S E, Loughlin K R, Gittes R F, Richie J P. 1986. Incidentally discovered mass of the adrenal gland. *Surg Gynecol Obstet*, 163(3): 203-8.
12. Bencsik Z, Szabolcs I, Kovacs Z, Ferencz A, Voros A, Kaszas I, Bor K, Gonczi J, Goth M, Kovacs L, Dohan O, Szilagyi G. 1996. Low dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) level is not a good predictor of hormonal activity in nonselected patients with incidentally detected adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(5): 1726-9.
13. Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. 1998. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 21(2): 172-5.
14. Bernini G P, Argenio G F, Vivaldi M S, Moretti A, Miccoli P, Iacconi P, Magagna A, Salvetti A. 1998. Utility of plasma dehydroepiandrosterone sulphate determination in adrenal incidentalomas. *J Endocrinol Invest*, 21(6): 365-71.
15. Berruti A, Terzolo M, Pia A, Angeli A, Dogliotti L. 1998. Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. *Cancer*, 83(10): 2194-200.
16. Beuschlein F, Reincke M, Karl M, Travis W D, Jaurisch-Hancke C, Abdelhamid S, Chrousos G P, Allolio B. 1994. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res*, 54(18): 4927-32.
17. Boland G W, Goldberg M A, Lee M J, Mayo-Smith W W, Dixon J, McNicholas M M, Mueller P R. 1995. Indeterminate adrenal mass in patients with cancer: evaluation at PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Radiology*, 194(1): 131-4.
18. Bornstein S R, Stratakis C A, Chrousos G P. 1999. Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. *Ann Intern Med*, 130(9): 759-71.
19. Caoili E M, Korobkin M, Francis I R, Cohan R H, Platt J F, Dunnick N R, Raghupathi K I. 2002. Adrenal masses: characterization with combined unenhanced and delayed enhanced CT. *Radiology*, 222(3): 629-33.
20. Caplan R H, Strutt P J, Wickus G G. 1994. Subclinical hormone secretion by incidentally discovered adrenal masses. *Arch Surg*, 129(3): 291-6.
21. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bokkerink J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voute P A, Versteeg R. 1996. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*, 334(4): 225-30.

22. Cerfolio R J, Vaughan E D, Jr., Brennan T G, Jr., Hirvela E R. 1993. Accuracy of computed tomography in predicting adrenal tumor size. *Surg Gynecol Obstet*, 176(4): 307-9.
23. Chen H, Doppman J L, Chrousos G P, Norton J A, Nieman L K, Udelsman R. 1995. Adrenocorticotrophic hormone-secreting pheochromocytomas: the exception to the rule. *Surgery*, 118(6): 988-94; discussion 994-5.
24. Crucitti F, Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, Crucitti P. 1996. The Italian Registry for Adrenal Cortical Carcinoma: analysis of a multiinstitutional series of 129 patients. The ACC Italian Registry Study Group. *Surgery*, 119(2): 161-70.
25. Dackiw A P, Lee J E, Gagel R F, Evans D B. 2001. Adrenal cortical carcinoma. *World J Surg*, 25(7): 914-26.
26. Dannenberg H, Speel E J, Zhao J, Saremaslani P, van Der Harst E, Roth J, Heitz P U, Bonjer H J, Dinjens W N, Mooi W J, Komminoth P, de Krijger R R. 2000. Losses of chromosomes 1p and 3q are early genetic events in the development of sporadic pheochromocytomas. *Am J Pathol*, 157(2): 353-9.
27. Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. 2000. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer*, 28(2): 145-52.
28. du Manoir S, Speicher M R, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T. 1993. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet*, 90(6): 590-610.
29. Dunnick N R, Korobkin M. 2002. Imaging of adrenal incidentalomas: current status. *AJR Am J Roentgenol*, 179(3): 559-68.
30. Edstrom E, Mahlamaki E, Nord B, Kjellman M, Karhu R, Hoog A, Goncharov N, Teh B T, Backdahl M, Larsson C. 2000. Comparative genomic hybridization reveals frequent losses of chromosomes 1p and 3q in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas, suggesting a common genetic etiology. *Am J Pathol*, 156(2): 651-9.
31. Ejeskar K, Sjoberg R M, Abel F, Kogner P, Ambros P F, Martinsson T. 2001. Fine mapping of a tumour suppressor candidate gene region in 1p36.2-3, commonly deleted in neuroblastomas and germ cell tumours. *Med Pediatr Oncol*, 36(1): 61-6.
32. Eng C, Crossey P A, Mulligan L M, Healey C S, Houghton C, Prowse A, Chew S L, Dahia P L, O'Riordan J L, Toledo S P, et al. 1995. Mutations in the RET proto-oncogene

- and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. *J Med Genet*, 32(12): 934-7.
33. Eng C, Foster K A, Healey C S, Houghton C, Gayther S A, Mulligan L M, Ponder B A. 1996. Mutation analysis of the c-mos proto-oncogene and the endothelin-B receptor gene in medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. *Br J Cancer*, 74(3): 339-41.
 34. Falchook F S, Allard J C. 1991. CT of primary adrenal lymphoma. *J Comput Assist Tomogr*, 15(6): 1048-50.
 35. Favia G, Lumachi F, D'Amico D F. 2001. Adrenocortical carcinoma: is prognosis different in nonfunctioning tumors? results of surgical treatment in 31 patients. *World J Surg*, 25(6): 735-8.
 36. Fontana D, Porpiglia F, Destefanis P, Fiori C, Ali A, Terzolo M, Osella G, Angeli A. 1999. What is the role of ultrasonography in the follow-up of adrenal incidentalomas? The Gruppo Piemontese Incidentalomi Surrenali. *Urology*, 54(4): 612-6.
 37. Fontana P, Facchetti F, Fiaccavento S. 1997. Fine-needle aspiration cytologic findings in a case of lymph node tumor of plasmacytoid monocytes. *Diagn Cytopathol*, 17(1): 57-60.
 38. Franquemont D W, Mills S E, Lack E E. 1994. Immunohistochemical detection of neuroblastomatous foci in composite adrenal pheochromocytoma-neuroblastoma. *Am J Clin Pathol*, 102(2): 163-70.
 39. Furukawa T, Sunamura M, Horii A. 2006. Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis. *Cancer Sci*, 97(1): 1-7.
 40. Gaboardi F, Carbone M, Bozzola A, Galli L. 1991. Adrenal incidentalomas: what is the role of fine needle biopsy? *Int Urol Nephrol*, 23(3): 197-207.
 41. Gaidano G, Hauptschein R S, Parsa N Z, Offit K, Rao P H, Lenoir G, Knowles D M, Chaganti R S, Dalla-Favera R. 1992. Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 80(7): 1781-7.
 42. Gajraj H, Young A E. 1993. Adrenal incidentaloma. *Br J Surg*, 80(4): 422-6.
 43. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos J M, Schlumberger M, Plouin P F, Luton J P, Le Bouc Y. 2001. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*, 61(18): 6762-7.
 44. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton J P, Girard F, Le Bouc Y. 1994. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like

- growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 78(6): 1444-53.
45. Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton J P, Girard F, Le Bouc Y. 1994. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 40(4): 465-77.
 46. Gicquel C, Raffin-Sanson M L, Gaston V, Bertagna X, Plouin P F, Schlumberger M, Louvel A, Luton J P, Le Bouc Y. 1997. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(8): 2559-65.
 47. Glazer H S, Weyman P J, Sagel S S, Levitt R G, McClennan B L. 1982. Nonfunctioning adrenal masses: incidental discovery on computed tomography. *AJR Am J Roentgenol*, 139(1): 81-5.
 48. Gronwald J, Storkel S, Holtgreve-Grez H, Hadaczek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T. 1997. Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res*, 57(3): 481-7.
 49. Gutmann D H, Geist R T, Rose K, Wallin G, Moley J F. 1995. Loss of neurofibromatosis type I (NF1) gene expression in pheochromocytomas from patients without NF1. *Genes Chromosomes Cancer*, 13(2): 104-9.
 50. Harada T, Shiraishi K, Kusano N, Umayahara K, Kondoh S, Okita K, Sasaki K. 2000. Evaluation of the reliability of chromosomal imbalances detected by combined use of universal DNA amplification and comparative genomic hybridization. *Jpn J Cancer Res*, 91(11): 1119-25.
 51. Healy E, Belgaid C, Takata M, Harrison D, Zhu N W, Burd D A, Rigby H S, Matthews J N, Rees J L. 1998. Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma. *Oncogene*, 16(17): 2213-8.
 52. Heppner C, Reincke M, Agarwal S K, Mora P, Allolio B, Burns A L, Spiegel A M, Marx S J. 1999. MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(1): 216-9.
 53. Heselmeyer K, Schrock E, du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T. 1996. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1): 479-84.
 54. Hirano Y, Fujita K, Suzuki K, Ushiyama T, Ohtawara Y, Tsuda F. 1998. Telomerase activity as an indicator of potentially malignant adrenal tumors. *Cancer*, 83(4): 772-6.

55. Hirata H, Matsuyama H, Matsumoto H, Korenaga Y, Ohmi C, Sakano S, Yoshihiro S, Naito K. 2005. Deletion mapping of 18q in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 163(2): 101-5.
56. Hirose Y, Aldape K, Takahashi M, Berger M S, Feuerstein B G. 2001. Tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR) is an effective method to analyze genetic aberrations in invasive tumors. *J Mol Diagn*, 3(2): 62-7.
57. Honigschnabl S, Gallo S, Niederle B, Prager G, Kaserer K, Lechner G, Heinz-Peer G. 2002. How accurate is MR imaging in characterisation of adrenal masses: update of a long-term study. *Eur J Radiol*, 41(2): 113-22.
58. Hooft C, Boedts F, Van Acker K. 1969. [Wiedemann-Beckwith syndrome (omphalocele-macroglossia-gigantism)]. *Ann Pediatr (Paris)*, 16(1): 49-56.
59. Hough A J, Hollifield J W, Page D L, Hartmann W H. 1979. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol*, 72(3): 390-9.
60. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, Cougard P, Henry J F, Proye C. 2001. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg*, 25(7): 891-7.
61. Inazawa J, Inoue J, Imoto I. 2004. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci*, 95(7): 559-63.
62. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. 1994. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*, 145(6): 1301-8.
63. Isola J J, Kallioniemi O P, Chu L W, Fuqua S A, Hilsenbeck S G, Osborne C K, Waldman F M. 1995. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am J Pathol*, 147(4): 905-11.
64. Jeuken J W, Sprenger S H, Wesseling P. 2002. Comparative genomic hybridization: practical guidelines. *Diagn Mol Pathol*, 11(4): 193-203.
65. Jiang J K, Chen Y J, Lin C H, Yu I T, Lin J K. 2005. Genetic changes and clonality relationship between primary colorectal cancers and their pulmonary metastases--an analysis by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 43(1): 25-36.

66. Joos S, Scherthan H, Speicher M R, Schlegel J, Cremer T, Lichter P. 1993. Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet*, 90(6): 584-9.
67. Kallioniemi A, Kallioniemi O P, Sudar D, Rutovitz D, Gray J W, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083): 818-21.
68. Kallioniemi O P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman F M, Gray J W, Pinkel D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 10(4): 231-43.
69. Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Lundsteen C. 1997. Automatic correction of the interfering effect of unsuppressed interspersed repetitive sequences in comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry*, 28(2): 130-4.
70. Kjellman M, Holst M, Backdahl M, Larsson C, Farnebo L O, Wedell A. 1999. No overrepresentation of congenital adrenal hyperplasia in patients with adrenocortical tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 50(3): 343-6.
71. Kjellman M, Kallioniemi O P, Karhu R, Hoog A, Farnebo L O, Auer G, Larsson C, Backdahl M. 1996. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res*, 56(18): 4219-23.
72. Kjellman M, Larsson C, Backdahl M. 2001. Genetic background of adrenocortical tumor development. *World J Surg*, 25(7): 948-56.
73. Koch C A, Pacak K, Chrousos G P. 2002. The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(12): 5367-84.
74. Korobkin M, Giordano T J, Brodeur F J, Francis I R, Siegelman E S, Quint L E, Dunnick N R, Heiken J P, Wang H H. 1996. Adrenal adenomas: relationship between histologic lipid and CT and MR findings. *Radiology*, 200(3): 743-7.
75. Larramendy M L, El-Rifai W, Knuutila S. 1998. Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 31(3): 174-9.
76. Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh F M, Orcutt M L, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, et al. 1993. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 260(5112): 1317-20.

77. Lenert J T, Barnett C C, Jr., Kudelka A P, Sellin R V, Gagel R F, Prieto V G, Skibber J M, Ross M I, Pisters P W, Curley S A, Evans D B, Lee J E. 2001. Evaluation and surgical resection of adrenal masses in patients with a history of extra-adrenal malignancy. *Surgery*, 130(6): 1060-7.
78. Li F P, Fraumeni J F, Jr. 1969. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*, 71(4): 747-52.
79. Liu J, Kahri A I, Heikkila P, Voutilainen R. 1997. Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(6): 1766-71.
80. Lockhart M E, Smith J K, Kenney P J. 2002. Imaging of adrenal masses. *Eur J Radiol*, 41(2): 95-112.
81. Lu W, Takahashi H, Furusato M, Maekawa S, Nakano M, Meng C, Kikuchi Y, Sudo A, Hano H. 2006. Allelotyping analysis at chromosome 13q of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and clinically insignificant and significant prostate cancers. *Prostate*, 66(4): 405-12.
82. Lui W O, Chen J, Glasker S, Bender B U, Madura C, Khoo S K, Kort E, Larsson C, Neumann H P, Teh B T. 2002. Selective loss of chromosome 11 in pheochromocytomas associated with the VHL syndrome. *Oncogene*, 21(7): 1117-22.
83. Lumachi F, Borsato S, Brandes A A, Boccagni P, Tregnaghi A, Angelini F, Favia G. 2001. Fine-needle aspiration cytology of adrenal masses in noncancer patients: clinicoradiologic and histologic correlations in functioning and nonfunctioning tumors. *Cancer*, 93(5): 323-9.
84. Lumachi F, Borsato S, Tregnaghi A, Basso S M, Marchesi P, Ciarleglio F, Fassina A, Favia G. 2003. CT-scan, MRI and image-guided FNA cytology of incidental adrenal masses. *Eur J Surg Oncol*, 29(8): 689-92.
85. Luton J P, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat M H, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, et al. 1990. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med*, 322(17): 1195-201.
86. Macfarlane D A. 1958. Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl*, 23(3): 155-86.
87. Malkin D, Li F P, Strong L C, Fraumeni J F, Jr., Nelson C E, Kim D H, Kassel J, Gryka M A, Bischoff F Z, Tainsky M A, et al. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250(4985): 1233-8.

88. Manger W M, Gifford R W, Jr., Hoffman B B. 1985. Pheochromocytoma: a clinical and experimental overview. *Curr Probl Cancer*, 9(5): 1-89.
89. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein S R. 2004. The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev*, 25(2): 309-40.
90. Mantero F, Masini A M, Opocher G, Giovagnetti M, Arnaldi G. 1997. Adrenal incidentaloma: an overview of hormonal data from the National Italian Study Group. *Horm Res*, 47(4-6): 284-9.
91. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini A M, Ali A, Giovagnetti M, Opocher G, Angeli A. 2000. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(2): 637-44.
92. Mathew S, Murty V V, Bosl G J, Chaganti R S. 1994. Loss of heterozygosity identifies multiple sites of allelic deletions on chromosome 1 in human male germ cell tumors. *Cancer Res*, 54(23): 6265-9.
93. Mermershtain W, Liel Y, Zirkin H J, Lupu L, Lantsberg S, Cohen Y. 2001. Primary bilateral adrenal lymphoma relapsing as a solid cerebral mass after complete clinical remission: a case report. *Am J Clin Oncol*, 24(6): 583-5.
94. Moch H, Presti J C, Jr., Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch M J, Waldman F M. 1996. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 56(1): 27-30.
95. Mody M K, Kazerooni E A, Korobkin M. 1995. Percutaneous CT-guided biopsy of adrenal masses: immediate and delayed complications. *J Comput Assist Tomogr*, 19(3): 434-9.
96. Moley J F, Brother M B, Fong C T, White P S, Baylin S B, Nelkin B, Wells S A, Brodeur G M. 1992. Consistent association of 1p loss of heterozygosity with pheochromocytomas from patients with multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Cancer Res*, 52(4): 770-4.
97. Morikawa A, Williams T Y, Dirix L, Colpaert C, Goodman M, Lyles R H, Zhong D, Zhou W. 2005. Allelic imbalances of chromosomes 8p and 18q and their roles in distant relapse of early stage, node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 7(6): R1051-7.
98. Morris C, Benjes S, Haataja L, Ledbetter D H, Heisterkamp N, Groffen J. 1995. Spatial organization of ABR and CRK genes on human chromosome band 17p13.3. *Oncogene*, 10(5): 1009-11.

99. Moul J W, Bishoff J T, Theune S M, Chang E H. 1993. Absent ras gene mutations in human adrenal cortical neoplasms and pheochromocytomas. *J Urol*, 149(6): 1389-94.
100. Mulligan L M, Kwok J B, Healey C S, Elsdon M J, Eng C, Gardner E, Love D R, Mole S E, Moore J K, Papi L, et al. 1993. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, 363(6428): 458-60.
101. Neumann H P, Bausch B, McWhinney S R, Bender B U, Gimm O, Franke G, Schipper J, Klisch J, Althoefer C, Zerres K, Januszewicz A, Eng C, Smith W M, Munk R, Manz T, Glaesker S, Apel T W, Treier M, Reineke M, Walz M K, Hoang-Vu C, Brauckhoff M, Klein-Franke A, Klose P, Schmidt H, Maier-Woelfle M, Peczkowska M, Szmigielski C. 2002. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med*, 346(19): 1459-66.
102. Ng L, Libertino J M. 2003. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol*, 169(1): 5-11.
103. NIH. 2002. NIH state-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). *NIH Consens State Sci Statements*, 19(2): 1-25.
104. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz P U. 1993. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer*, 54(3): 408-10.
105. Pena C S, Boland G W, Hahn P F, Lee M J, Mueller P R. 2000. Characterization of indeterminate (lipid-poor) adrenal masses: use of washout characteristics at contrast-enhanced CT. *Radiology*, 217(3): 798-802.
106. Petersen I, Schwendel A, Bockmuhl U, Dietel M. 1996. [Comparative genomic hybridization. A screening method in genetic tumor diagnosis]. *Pathologe*, 17(5): 333-41.
107. Phillips J L, Ghadimi B M, Wangsa D, Padilla-Nash H, Worrell R, Hewitt S, Walther M, Linehan W M, Klausner R D, Ried T. 2001. Molecular cytogenetic characterization of early and late renal cell carcinomas in von Hippel-Lindau disease. *Genes Chromosomes Cancer*, 31(1): 1-9.
108. Pommier R F, Brennan M F. 1992. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. *Surgery*, 112(6): 963-70; discussion 970-1.
109. Reincke M, Karl M, Travis W H, Mastorakos G, Allolio B, Linehan H M, Chrousos G P. 1994. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 78(3): 790-4.

110. Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I. 1996. [Analysis program for quantitative detection of chromosome aberrations using comparative genomic hybridization]. *Pathologe*, 17(5): 342-8.
111. Saboorian M H, Katz R L, Charnsangavej C. 1995. Fine needle aspiration cytology of primary and metastatic lesions of the adrenal gland. A series of 188 biopsies with radiologic correlation. *Acta Cytol*, 39(5): 843-51.
112. Saeger W, Reinhard K, Reinhard C. 1998. Hyperplastic and Tumorous Lesions of the Adrenals in an Unselected Autopsy Series. *Endocr Pathol*, 9(3): 235-239.
113. Saeger W, Schroder S, Kloppel G. 2001. [Pathology of important diseases of endocrine organs (excluding the thyroid)]. *Pathologe*, 22(5): 296-309.
114. Sasano H, Suzuki T, Moriya T. 2001. Discerning malignancy in resected adrenocortical neoplasms. *Endocr Pathol*, 12(4): 397-406.
115. Schroder S, Komminoth P, Padberg B, Heitz P U. 1995. [Morphological typing, evaluation of tumor dignity and prognosis and etiologic classification of adrenomedullary and adrenocortical neoplasias]. *Pathologe*, 16(5): 307-14.
116. Schroder S, Padberg B C. 1991. [Pathology of 2A and 2B multiple endocrine neoplasia-a current assessment]. *Pathologe*, 12(3): 131-7.
117. Schteingart D E. 2001. Current perspective in the diagnosis and treatment of adrenocortical carcinoma. *Rev Endocr Metab Disord*, 2(3): 323-33.
118. Schulte K M, Heinze M, Mengel M, Simon D, Scheuring S, Kohrer K, Roher H D. 1999. MEN I gene mutations in sporadic adrenal adenomas. *Hum Genet*, 105(6): 603-10.
119. Schulte K M, Mengel M, Heinze M, Simon D, Scheuring S, Kohrer K, Roher H D. 2000. Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN I gene in adrenal cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(1): 441-8.
120. Schussheim D H, Skarulis M C, Agarwal S K, Simonds W F, Burns A L, Spiegel A M, Marx S J. 2001. Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol Metab*, 12(4): 173-8.
121. Shulkin B L, Koeppe R A, Francis I R, Deeb G M, Lloyd R V, Thompson N W. 1993. Pheochromocytomas that do not accumulate metaiodobenzylguanidine: localization with PET and administration of FDG. *Radiology*, 186(3): 711-5.
122. Sidhu S, Gicquel C, Bambach C P, Campbell P, Magarey C, Robinson B G, Delbridge L W. 2003. Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumourigenesis. *ANZ J Surg*, 73(9): 727-38.

123. Sidhu S, Marsh D J, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach C P, Campbell P, Magarey C J, Russell C F, Schulte K M, Roher H D, Delbridge L, Robinson B G. 2002. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(7): 3467-74.
124. Snijders A M, Pinkel D, Albertson D G. 2003. Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2(1): 37-45.
125. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 20(4): 399-407.
126. Speel E J, Richter J, Moch H, Egenter C, Saremaslani P, Rutimann K, Zhao J, Barghorn A, Roth J, Heitz P U, Komminoth P. 1999. Genetic differences in endocrine pancreatic tumor subtypes detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, 155(6): 1787-94.
127. Speicher M R, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T. 1993. Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet*, 2(11): 1907-14.
128. Stojadinovic A, Ghossein R A, Hoos A, Nissan A, Marshall D, Dudas M, Cordon-Cardo C, Jaques D P, Brennan M F. 2002. Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization. *J Clin Oncol*, 20(4): 941-50.
129. Storkel S, Simon R, Brinkschmidt C, Gronwald J, Bocker W. 1996. [Comparative genomic hybridization in pathology. A new molecular cytogenetic method]. *Pathologe*, 17(3): 189-94.
130. Sullivan M, Boileau M, Hodges C V. 1978. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol*, 120(6): 660-5.
131. Szolar D H, Kammerhuber F. 1997. Quantitative CT evaluation of adrenal gland masses: a step forward in the differentiation between adenomas and nonadenomas? *Radiology*, 202(2): 517-21.
132. Tanabe A, Naruse M, Nishikawa T, Yoshimoto T, Shimizu T, Seki T, Takagi S, Imaki T, Takano K. 2001. Autonomy of cortisol secretion in clinically silent adrenal incidentaloma. *Horm Metab Res*, 33(7): 444-50.

133. Tanaka N, Nishisho I, Yamamoto M, Miya A, Shin E, Karakawa K, Fujita S, Kobayashi T, Rouleau G A, Mori T, et al. 1992. Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 22 in pheochromocytoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 5(4): 399-403.
134. Telenius H, Carter N P, Bebb C E, Nordenskjold M, Ponder B A, Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13(3): 718-25.
135. Terzolo M, Ali A, Pia A, Bollito E, Reimondo G, Paccotti P, Scardapane R, Angeli A. 1994. Cyclic Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion by an adrenal pheochromocytoma. *J Endocrinol Invest*, 17(11): 869-74.
136. Terzolo M, Osella G, Ali A, Borretta G, Cesario F, Paccotti P, Angeli A. 1998. Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentaloma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 48(1): 89-97.
137. Tsukamoto K, Ito N, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M. 1998. Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. *Cancer*, 82(2): 317-22.
138. Valli N, Catargi B, Ronci N, Vergnot V, Leccia F, Ferriere J M, Chene G, Grenier N, Laurent F, Tabarin A. 2001. Biochemical screening for subclinical cortisol-secreting adenomas amongst adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol*, 144(4): 401-8.
139. van der Harst E, de Krijger R R, Bruining H A, Lamberts S W, Bonjer H J, Dinjes W N, Proye C, Koper J W, Bosman F T, Roth J, Heitz P U, Komminoth P. 1998. Prognostic value of RET proto-oncogene point mutations in malignant and benign, sporadic pheochromocytomas. *Int J Cancer*, 79(5): 537-40.
140. van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar A J. 1985. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer*, 55(4): 766-73.
141. Vargas M P, Zhuang Z, Wang C, Vortmeyer A, Linehan W M, Merino M J. 1997. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosomes 1 and 3 in sporadic pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma. *Hum Pathol*, 28(4): 411-5.
142. Veltman J A, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen A B, Korkola J E, DeVries S, Carroll P, Kuo W L, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain A N, Waldman F M. 2003. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res*, 63(11): 2872-80.
143. Venkatesh S, Hickey R C, Sellin R V, Fernandez J F, Samaan N A. 1989. Adrenal cortical carcinoma. *Cancer*, 64(3): 765-9.

144. Vortmeyer A O, Huang S C, Pack S D, Koch C A, Lubensky I A, Oldfield E H, Zhuang Z. 2002. Somatic point mutation of the wild-type allele detected in tumors of patients with VHL germline deletion. *Oncogene*, 21(8): 1167-70.
145. Wachenfeld C, Beuschlein F, Zwermann O, Mora P, Fassnacht M, Allolio B, Reincke M. 2001. Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful? *Eur J Endocrinol*, 145(3): 335-41.
146. Wagner J, Portwine C, Rabin K, Leclerc J M, Narod S A, Malkin D. 1994. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 86(22): 1707-10.
147. Wajchenberg B L, Albergaria Pereira M A, Medonca B B, Latronico A C, Campos Carneiro P, Alves V A, Zerbini M C, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner M A. 2000. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*, 88(4): 711-36.
148. Wales M M, Biel M A, el Deiry W, Nelkin B D, Issa J P, Cavenee W K, Kuerbitz S J, Baylin S B. 1995. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med*, 1(6): 570-7.
149. Wang J, Sun N C, Renslo R, Chuang C C, Tabbarah H J, Barajas L, French S W. 1998. Clinically silent primary adrenal lymphoma: a case report and review of the literature. *Am J Hematol*, 58(2): 130-6.
150. Weiss L M. 1984. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*, 8(3): 163-9.
151. Weiss L M, Medeiros L J, Vickery A L, Jr. 1989. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 13(3): 202-6.
152. Weiss M M, Hermsen M A, Meijer G A, van Grieken N C, Baak J P, Kuipers E J, van Diest P J. 1999. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol*, 52(5): 243-51.
153. Weiss M M, Kuipers E J, Meuwissen S G, van Diest P J, Meijer G A. 2003. Comparative genomic hybridisation as a supportive tool in diagnostic pathology. *J Clin Pathol*, 56(7): 522-7.
154. Welch T J, Sheedy P F, 2nd, Stephens D H, Johnson C M, Swensen S J. 1994. Percutaneous adrenal biopsy: review of a 10-year experience. *Radiology*, 193(2): 341-4.
155. Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, Nessling M, Lampel S, Goettel D, Kuepper M, Joos S, Hopman T, Kokocinski F, Dohner H, Bentz M, Schwaenen C, Lichter P. 2002. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest*, 82(1): 47-60.

156. Whalen R K, Althausen A F, Daniels G H. 1992. Extra-adrenal pheochromocytoma. *J Urol*, 147(1): 1-10.
157. Wilkens L, Tchinda J, Burkhardt D, Kreipe H H. 2002. Significant hybridization differences in comparative genomic hybridization due to nucleotides used for DNA labelling and to DNA chosen for cohybridization. *Pathobiology*, 70(4): 204-8.
158. Wu H H, Cramer H M, Kho J, Elsheikh T M. 1998. Fine needle aspiration cytology of benign adrenal cortical nodules. A comparison of cytologic findings with those of primary and metastatic adrenal malignancies. *Acta Cytol*, 42(6): 1352-8.
159. Xu W, Mulligan L M, Ponder M A, Liu L, Smith B A, Mathew C G, Ponder B A. 1992. Loss of NF1 alleles in phaeochromocytomas from patients with type I neurofibromatosis. *Genes Chromosomes Cancer*, 4(4): 337-42.
160. Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. 1995. p19Sklp1 and p45Sklp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell*, 82(6): 915-25.
161. Zhao J, Speel E J, Muletta-Feurer S, Rutimann K, Saremaslani P, Roth J, Heitz P U, Komminoth P. 1999. Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. *Am J Pathol*, 155(4): 1039-45.
162. Zografos G C, Driscoll D L, Karakousis C P, Huben R P. 1994. Adrenal adenocarcinoma: a review of 53 cases. *J Surg Oncol*, 55(3): 160-4.

Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Friedrich- Schiller- Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Kerstin Junker, Herr Prof. Dr. Jörg Schubert, Frau Bianka Ilse, Frau Jana Jeschke, Frau Jimse Sanjmyatav, Frau Heike Wahner, Frau Antje Herzer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Torsten Gruschwitz

Lebenslauf

Name: Gruschwitz, Torsten

Adresse: Theobald- Renner- Straße 68, 07747 Jena

Geburtsdatum: 04.07.1979

Geburtsort: Bad Salzungen

Familienstand: ledig, 1 Kind

Schul Ausbildung:

1986 – 1991	Grundschule Walldorf
1991 – 1998	Henfling- Gymnasium Meiningen
1998	Abitur

Hochschulausbildung:

1999 – 2005	Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2001	Ärztliche Vorprüfung
2003	1. Staatsexamen
2004	2. Staatsexamen
2005	3. Staatsexamen

Klinische Praktika:

10/2004 – 02/2005	Klinik für Chirurgie, Kantonsspital Aarau, Schweiz
02/2005 – 06/2005	Klinik für Urologie, Friedrich- Schiller- Universität Jena
06/2005 – 09/2005	Klinik für Innere Medizin, Sophien- und Hufeland- Klinikum Weimar

Facharztausbildung:

Seit 04/2006	Anstellung als Assistenzarzt, Klinik für Urologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
--------------	--

Promotion:

03/2003	Beginn der Promotionsarbeit
10/2005 – 03/2006	Promotionsstipendium des IZKF der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Danksagung

Zu großem Dank bin ich Frau PD Dr. Kerstin Junker verpflichtet, welche durch ihre engagierte Arbeit und ihre freundliche, couragierte und motivierende Betreuung erheblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat.

Ein Teil der untersuchten Nebennierentumoren stammt aus der Tumorbank der Urologischen Klinik der Universität Bratislava/ Slowakei, daher danke ich den Mitarbeitern dieser Klinik ganz besonders für das Überlassen des Materials.

Dem Direktor der Urologischen Klinik der Friedrich- Schiller- Universität Jena, Herrn Prof. Dr. J. Schubert, danke ich für die Hinweise und Ratschläge zur Optimierung einzelner Passagen und die positive Einschätzung dieser Promotionsarbeit.

Ein Dank gilt den Vertretern des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung der Friedrich- Schiller- Universität Jena, welche vom Konzept dieser Promotion überzeugt waren und mir durch die Vergabe eines Promotionsstipendiums ein intensives Arbeiten an dieser Promotion ermöglichten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei all den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Forschungslabors der Urologischen Universitätsklinik Jena, welche mir bei der experimentellen Arbeit tatkräftig und kompetent zur Seite standen.
Dazu danke ich Herrn Marco Wolf für die Hilfe beim Erstellen des Layouts der Arbeit.

Ein großer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Frau Antje Herzer für ihre Geduld, die aufmunternden Worte und ihre liebenswerte Art, mit der sie mich stets unterstützt.

Auch meiner Familie möchte ich für das oftmals bekundete Interesse an meiner Arbeit und der sich für mich daraus ableitenden Motivation danken.

